



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV MECHANIKY TĚLES, MECHATRONIKY A BIOMECHANIKY

INSTITUTE OF SOLID MECHANICS, MECHATRONICS AND BIOMECHANICS

ANALÝZA VLIVU USPOŘÁDÁNÍ KOLAGENU NA MECHANICKÉ VLASTNOSTI TEPEN

ANALYSIS OF INFLUENCE OF COLLAGEN ORGANIZATION ON MECHANICAL PROPERTIES OF
ARTERIES

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ING. KAMIL NOVÁK

ŠKOLITEL
SUPERVISOR

PROF. ING. JIŘÍ BURŠA, PH.D.

ŠKOLITEL SPECIALISTA
CO-SUPERVISOR

ING. STANISLAV POLZER, PH.D.

BRNO 2018

Tato doktorská práce je věnována celé mé rodině,
rodičům, Miloslavovi a Oldřišce,
ženě Soni a synovi Jirímu.

Jsou mým nekonečným zdrojem podpory a účelu na tomto světě.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně s použitím odborné literatury a jiných informačních zdrojů, které jsou řádně citovány v seznamu literatury.

Práce je psána v českém jazyce.

Ing. Kamil Novák

.....

Abstrakt

Tato disertační práce se zabývá *Vlivem uspořádání kolagenu na mechanické vlastnosti tepen* a je rozdělena do tří nejdůležitějších částí.

Motivace pro tuto doktorskou práci byla ve studii revidující vliv modelu materiálu na výsledné napětí v AAA. Určení vlivu modelu materiálu bylo provedeno na 70 geometriích AAA, což o řád přesahuje množství geometrií použitých v jiných publikacích. Byly využity dva modely materiálu, tj. reálný a 100× tužší a výsledné hodnoty napětí byly porovnány. Bylo vyhodnoceno, že v analyzované skupině 70 pacientů existuje ~10 % pacientů, u kterých odchylka maximálního napětí od referenčního modelu přesahuje 20 %. Výsledky napětí mohou tedy být závislé na zvoleném modelu materiálu a je vhodné upřednostnit ten reálný, ačkoliv práce s ním je náročnější.

Druhá oblast práce se věnuje identifikaci strukturních parametrů (orientaci a disperzi kolagenních vláken) z prasečí aorty pomocí upraveného algoritmu rychlé Fourierovy transformace. Získané strukturní parametry byly vloženy do dvouvrstvého strukturně motivovaného konstitutivního modelu Martufi-Gasser. Tento model byl validován a měl výborné predikční schopnosti. Nejpodstatnější z analýzy obrazu provedené na ~9000 mikrosnímcích je zjištění, že ve stěně zdravé prasečí hrudní aorty existuje jen jedna rodina kolagenních vláken s rozptylem, což boří dogma o dvou rodinách kolagenních vláken zavedené ve světové literatuře.

Třetí část práce je věnována návrhu automatického algoritmu pro detekci lokálních směrů kolagenních vláken ze snímků pořízených pomocí polarizované mikroskopie na základě fázové korelace obrazu. Navrhnutý algoritmus byl verifikován a validován. Výsledkem algoritmu jsou histogramy orientací obsahující nesrovnatelně větší množství bodů, než umožňují jakákoli manuální měření. Limitací u původního algoritmu byl rozsah úhlů 0° – 90° na základě principiálních omezení periodou intensity samotné polarizované mikroskopie. Závěr práce je věnován rozšíření zmíněného algoritmu na rozsah úhlů 0° – 180° . Za tímto účelem bylo změněno nastavení mikroskopu a algoritmus byl podle tohoto nastavení přeprogramován. Původní i nový algoritmus jsou velmi rychlé, přesné a specifické pro opticky dvojlomné struktury.

I přes veškerou snahu autora této dizertační práce zůstává otázka automatického měření vlnitosti kolagenních vláken přímo z výsledných histogramů zatím ve stádiu výzkumu.

Abstract

This dissertation thesis concerns with *Analysis of Influence of Collagen Organization on Mechanical Properties of Arteries* and it is divided into three main parts.

Motivation for this dissertation thesis was in a study reviewing effect of material model upon resulting stresses in AAA. The effect was calculated in 70 patient-specific geometries of AAA, which exceeds the number of geometries in other scientific papers by one order. Within this study, two material models were used, i.e. real one and 100× stiffer, and obtained stresses were mutually compared. It was quantified that peak stress difference can be higher than 20 % in 10% of patients and therefore the real material model should be preferred over the artificial one although operation with this model is more demanding.

The second part of this thesis deals with an identification of structural parameters (orientation and dispersion of collagen fibres) of porcine aortic tissue by using adjusted Fast Fourier Transform based algorithm. The extracted structural parameters were inserted into two-layer structure-motivated constitutive model Martufi-Gasser. This model was validated and its predictive capabilities were also tested with fine results. The most important information obtained from the digital image processing of ~9000 micrographs is existence of only one family of dispersed collagen fibres which breaks the current dogma present in many scientific papers about two families of collagen fibres.

The third part concerns with a proposal of an automated phase-correlation based algorithm for obtaining collagen fibre direction from polarized light microscopy images. The proposed algorithm was verified and validated and it yields histograms of collagen fibre directions with overall number of measured points larger than it would be possible to get from any manual measurement. The limitation of the original proposed algorithm is in 90° period of polarized light intensity, thus the method results in angles in the range of 0°–90°. Therefore the end of the thesis is dedicated resolving this problem and obtaining real angles in a span of 0°–180°. To this end, the microscope set-up was changed and the algorithm was adjusted accordingly. The original and the adjusted algorithms are collagen-specific, fast and an operator independent.

Despite all the author's effort put into collagen fibre waviness quantification directly from the histograms, the waviness has not been quantified yet in this way and it remains at the stage of research.

Poděkování

Velmi rád bych vyjádřil své hluboké a upřímné poděkování mému vedoucímu dizertační práce, panu profesorovi Ing. Jiřímu Buršovi, Ph.D. Jeho rozsáhlé znalosti a logické myšlení byly pro mě více než přínosné a umožnily mi dokončit tuto práci. Mé velké díky patří i školiteli specialistovi, který mi věnoval nespočetné množství hodin, abychom spolu vyřešili nepřehledné množství problémů. Jsem si jist, že bez obou těchto lidí by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

Rád bych také poděkoval všem členům našeho týmu, jmenovitě Ing. Pavlu Skácelovi, Ph.D., Ing. Vojtěchu Manovi a Ing. Martinu Slažanskému. Poděkování patří taktéž týmu lékařů z Fakultní nemocnice U sv. Anny, jmenovitě prof. MUDr. Robertovi Staffovi, Ph.D., MUDr. Robertovi Vlachovskému, Ph.D., MUDr. Luboši Kubíčkovi., radiologům MUDr. Tomáši Křivkovi, Ing. MUDr. Lukáši Lambertovi, Ph.D. a histologům prof. MUDr. Markétě Hermanové, Ph.D. a MUDr. Michalovi Tichému.

Děkuji také své rodině a hlavně ženě Soni, která mě podporovala po celou dobu Ph.D. studia.

Obsah

1	ÚVOD.....	13
1.1	CÍLE PRÁCE	13
2	LÉKAŘSKÁ PROPEDEUTIKA	14
2.1	ANEURYSMA BŘIŠNÍ AORTY	14
2.2	ANATOMIE ZDRAVÉ STĚNY TEPNY.....	15
2.2.1	Tunica intima.....	16
2.2.2	Tunica media	17
2.2.3	Tunica adventitia.....	18
2.3	GLOBÁLNÍ VZHLED TKÁNĚ PŘI AAA PATOLOGII	18
3	MECHANICKÉ VLASTNOSTI TKÁNĚ	20
3.1	KOLAGEN	20
3.2	ELASTIN	22
3.3	HLADKÉ SVALOVÉ BUŇKY	22
4	HYPERELASTICKÉ KONSTITUTIVNÍ MODEL Y.....	24
4.1	FENOMENOLOGICKÝ IZOTROPNÍ MODEL YEOH.....	25
4.2	STRUKTURNĚ MOTIVOVANÉ MODEL Y	26
4.2.1	Izotropní model Neo-Hooke	27
4.2.2	Anizotropní model y materiálu	28
	Holzapfel 2000 (Holzapfel – Gasser – Ogden)	28
	Holzapfel 2005.....	28
	Gasser 2006	31
	Martufi-Gasser model 2011	33
4.3	VLIV KONSTITUTIVNÍHO MODELU NA NAPĚTÍ V AAA.....	35
5	PŘÍPRAVA VZORKŮ A HISTOLOGIE.....	37
6	VIZUALIZACE TKÁNĚ.....	40
6.1	OPTICKÁ MIKROSKOPIE	40
6.1.1	Mikroskopické vybavení	41
6.1.2	Princip polarizované mikroskopie.....	42
7	USPOŘÁDÁNÍ KOLAGENNÍCH VLÁKEN VE STĚNĚ TEPNY.....	43
7.1	DOMINANTNÍ SMĚRY A ROZPTYL KOLAGENNÍCH VLÁKEN.....	43
7.1.1	Rovinná vs. prostorová orientace.....	45

7.1.2	Analýza způsobů měření orientace	46
7.2	VLNITOST KOLAGENNÍCH VLÁKEN	50
7.2.1	Analýza způsobů měření vlnitosti	51
8	ZHODNOCENÍ KRITÉRIA MAXIMÁLNÍHO PRŮMĚRU AAA	53
8.1	ALTERNATIVNÍ PREDIKTORY RIZIKA RUPTURY	54
8.2	KORELACE MEZI PRŮMĚREM AAA A ALTERNATIVNÍMI PREDIKTORY RIZIKA RUPTURY	55
9	VLIV MODELU MATERIÁLU VE VÝPOČTOVÉM MODELOVÁNÍ	60
10	VALIDACE STRUKTURNĚ MOTIVOVANÉHO KONST. MODELU	64
10.1	DETEKCE SMĚRŮ KOLAGENNÍCH VLÁKEN POMOCÍ ALGORITMU ZALOŽENÉHO NA FFT	64
10.2	MECHANICKÉ TESTOVÁNÍ TKÁNĚ	67
10.3	VALIDACE A PREDIKČNÍ SCHOPNOSTI MODELU	68
10.4	DISKUSE A MOŽNÉ OMEZENÍ STUDIE	72
11	DETEKCE SMĚRŮ KOLAGENNÍCH VLÁKEN POMOCÍ ALGORITMU ZALOŽENÉHO NA FÁZOVÉ KORELACI	74
11.1	FÁZOVÁ KORELACE OBRAZU	74
11.2	PREDIKCE VYHASNUTÍ BODU - ÚHEL VLÁKNA	80
11.3	VERIFIKACE ALGORITMU	81
11.4	VALIDACE ALGORITMU	84
11.5	DISKUSE A OMEZENÍ NAVRHNUTÉHO ALGORITMU	88
12	ÚPRAVA NASTAVENÍ MIKROSKOPU A ALGORITMU	89
12.1	PRINCIP ÚPRAVY ALGORITMU NA MODROU BARVU	89
12.2	POSOUZENÍ VĚROHODNOSTI VÝSLEDKŮ	91
12.3	IDENTIFIKACE VLNITOSTI – SOUČASNÝ STAV A OMEZENÍ	93
12.4	PRINCIP ÚPRAVY ALGORITMU NA ZELENOU BARVU	97
12.4.1	Predikce minima intenzity bodu – úhlu vlákna	99
12.5	ZHODNOCENÍ UPRAVENÝCH ALGORITMŮ	102
13	NÁVRH DALŠÍ STUDIE	104
14	ZÁVĚR	105

1 ÚVOD

S rozvojem dnešní doby se čím dál tím více setkáváme s celosvětovým nárůstem kardiovaskulárních onemocnění. Mezi tato život ohrožující onemocnění lze zařadit například výduť tepenné stěny, tzv. aneurysma. V oblasti břicha odborně nazýváno aneurysma abdominální aorty (AAA). Takové aneurysma je většinou bezpříznakové a bez existence screeningového programu bývá odhaleno často jen náhodou. Aneurysma se tak pozvolna zvětšuje až do své případné ruptury (protržení). To má i při nejlepší dosažitelné péči pro pacienta často katastrofické následky – vykrvácení a smrt.

Je-li u pacienta AAA zjištěno, o jeho operaci se v klinické praxi rozhoduje podle maximálního průměru a rychlosti růstu. Oba parametry však trpí nedostatečnou schopností rozlišit skutečně riziková aneurysmata od těch stabilních. Díky tomu řada vědců využívá výpočtové modelování k nalezení jiných parametrů vypovídajících o skutečné rizikovosti AAA, tj. maximální napětí ve stěně a (pravděpodobnostní) parametr rizika ruptury. Tyto parametry umožňují komplexní posouzení rizikovosti na základě zahrnutí různých vlivů, tj. samotné geometrie AAA, velikosti krevního tlaku, přítomnosti intraluminálního trombu (ILT)¹, a mechanických vlastností materiálu stěny AAA a ILT včetně jejich heterogenity (nejvýraznější u kalcifikací). Vliv samotného modelu materiálu stěny není aktuálně dořešen, tj. některé studie ho ignorují a některé ho vidí jako významný. Díky této nejasnosti byly definovány následující cíle práce.

1.1 CÍLE PRÁCE

- Provést rešerši z oblasti modelů materiálu stěny tepny a AAA a posoudit, zda je vliv modelu materiálu podstatný či nikoliv.
- Provést rešerši z oblasti histologie, anatomie a patologie tkáně stěny tepny se zaměřením na uspořádání kolagenních vláken
- Kvantifikovat orientaci, směrový rozptyl (disperzi) a vlnitost kolagenních vláken ve stěně tepny, zavést je do vybraného konstitutivního modelu a ověřit predikční schopnosti tohoto modelu
- Navrhnout nové automatické algoritmy pro posouzení uspořádání kolagenních vláken v tkáni ze snímků polarizované mikroskopie.

¹Krevní sraženina vyplňující aneurysmatický vak, ILT je přítomno u ~70 % AAA, viz (Harter et al. 1982)

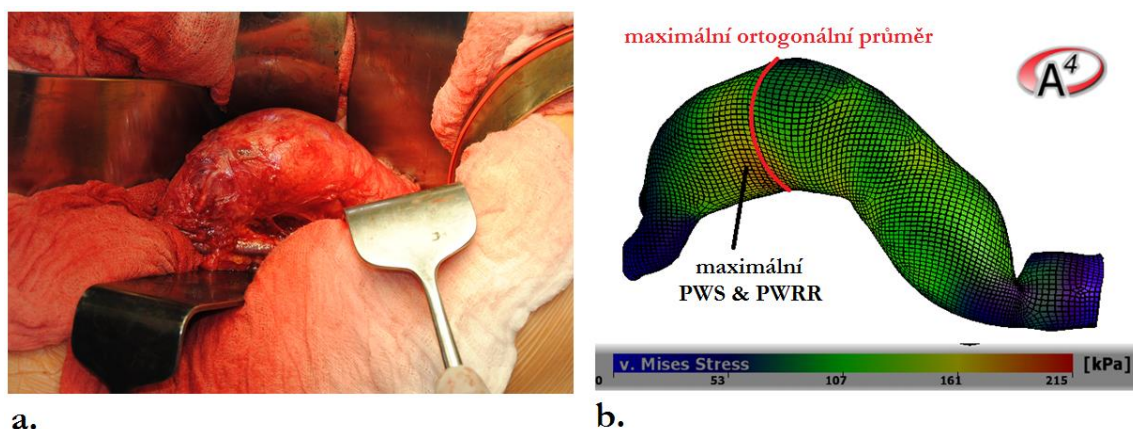
2 LÉKAŘSKÁ PROPEDEUTIKA

Vzhledem k specifičnosti této doktorské práce je důležité seznámit čtenáře s úvodem (propedeutikou) do anatomie cév; konkrétně do anatomie artérií (tepen) zdravých i patologických. Protože se již v úvodu a v dalších kapitolách mluví o aneurysmatech, považuje autor této dizertační práce za důležité, pojem „aneurysma“ přesně definovat hned na začátku celé práce.

2.1 ANEURYSMA BŘÍŠNÍ AORTY

Jedná se o progresivní, permanentní a nevratnou lokální dilataci artérie. Za aneurysma se považuje artérie s infrarenálním² průměrem větším než 30 mm (McGregor et al. 1975). Tato hodnota by odpovídala přibližně nárůstu o 50 % vůči průměru zdravé tepny (Grimshaw a Thompson 1997), což je zároveň i druhá možnost jak definovat AAA.

Aby se jednalo o tzv. pravé aneurysma, zmíněná dilatace musí postihnout všechny tři vrstvy cévní stěny, jinak je dilatace nazývána jako pseudo-aneurysma. Většina aneurysmat aorty jsou fusiformní (vřetenovitá – viz Obrázek 1), u kterých je dilatace přibližně symetrická po celém obvodu. Pokud je zvětšená jen část obvodu, vzniklé aneurysma má přibližně kulovitý tvar a je nazýváno jako vakovité (sakulární). Prevalence sakulárních aneurysmat břišní aorty je podle našich spolupracujících lékařů menší než jedno AAA za dva roky; v hrudní oblasti je prevalence více frekventovaná, viz (Shang et al. 2013). Sakulární výdutě naopak dominují u mozkových tepen s četností ~90 % a nejčastějším vznikem v tzv. Willisově tepenném okruhu (Keedy 2006).



Obrázek 1. Fusiformní abdominální aneurysma 67 leté ženy s maximálním ortogonálním³ průměrem 50mm. Snímek (a.) zobrazuje AAA během operace a obrázek (b.) jeho konečno-prvkový model. Na konečno-prvkovém modelu je vykresleno napětí podle podmínky von Mises. Maximální ortogonální průměr jeobrazen červeně. Zkratky PWS = Peak Wall Stress (viz str. 54) a PWRR = Peak Wall Rupture Risk (viz str. 54).

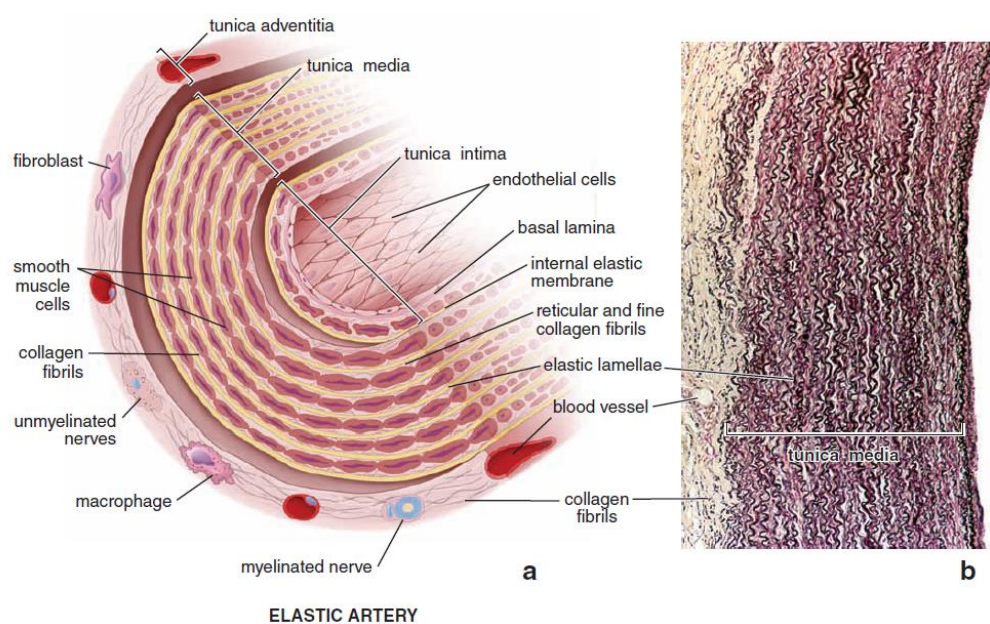
² mezi odstupem renálních tepen a aortální bifurkací

³ Ortogonální průměr AAA – průměr měřený kolmo ke střednici (proudnici).

2.2 ANATOMIE ZDRAVÉ STĚNY TEPNY

Stěna zdravé artérie se skládá ze tří vrstev (zevnitř ven je to intima, medie a adventicie). Každá z těchto vrstev bude dále popsána v kapitolách 2.2.1–2.2.3. Samotné artérie jsou pak rozděleny do několika skupin na základě jejich velikosti, podle složení a vzhledu střední vrstvy. Z hlediska náplně této práce jsou však nejdůležitější jen dva základní typy. „Velké“ neboli **artérie elastického typu**, viz Obrázek 2, jako je aorta⁴, dopravují krev od srdce k orgánům. Tyto artérie jsou většinou většího průměru (>10 mm) a mají relativně tenkou adventicii v porovnání s medií. Hlavní větve jako hlavově-pažní kmen (rozdvojen na pravou společnou krční tepnu a podklíčkovou tepnu), levá společná krční tepna a podklíčková tepna a společné kyčelní tepny jsou taktéž klasifikovány jako elastické artérie. **Střední artérie** neboli **artérie svalového typu** jsou obecně menšího průměru (2–10 mm v průměru; adventicie tloušťkou srovnatelná s medií), ale někdy těžko rozlišitelné od elastických (hranice je neostrá), neboť mají podobné mikroskopické vlastnosti.

Více informací je možné nalézt v 13. kapitole v knize (Ross a Pawlina), kde je ukázán kompletní kardiovaskulární systém.



Obrázek 2: Artérie elastického typu. Levá část (a.) reprezentuje schématický náčrt elastického typu cévy a pravá část (b.) reprezentuje vybraný úsek vzorku pod mikroskopem. Je zobrazena především (tunica) medie. Vzorok na mikrosnímku (b.) byl barven Weigertovým barvivem. Zvětšení 48×. Převzato z (Ross a Pawlina).

Překlad: fibroblast – fibroblast, smooth muscle cells – hladké svalové buňky collagen fibrils – kolagenní fibrily, unmyelinated nerves – nemylinizované nervy, macrophage – makrofág, myelinated nerve – myelinizované nervy, endothelial cells – buňky endotelu, basal lamina – bazální lamina, internal elastic membrane – vnitřní elastická membrána, reticular and fine collagen fibrils – retikulární a jemné kolagenní fibrily, elastic lamellae – elastické lamely, blood vessel – krevní kanálek (vasa vasorum).

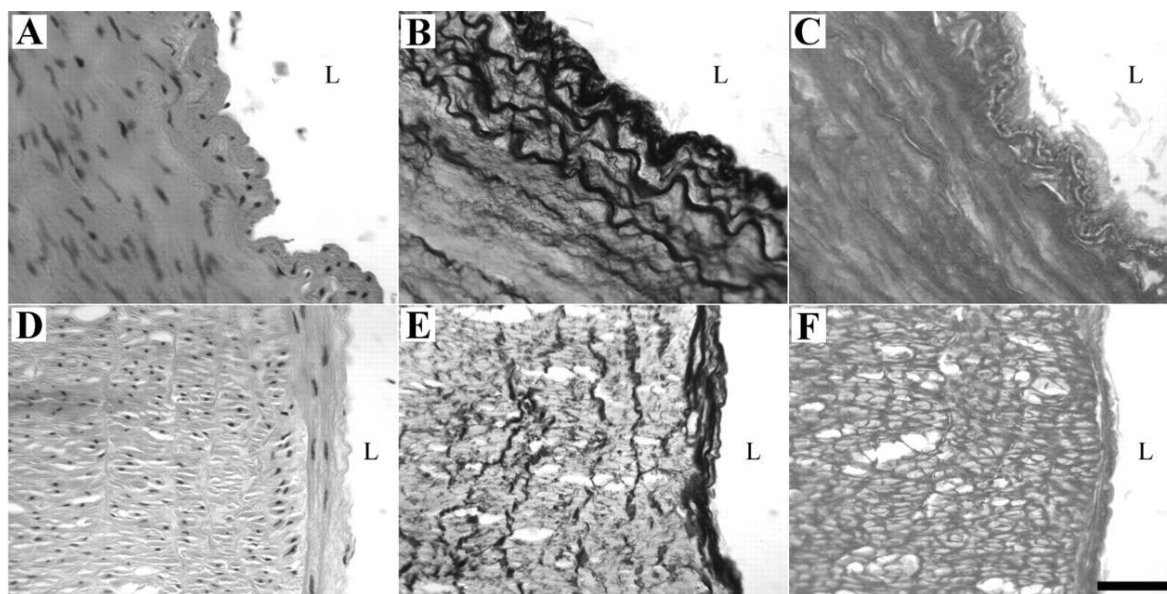
⁴ Největší tepna v těle savců

2.2.1 Tunica intima

Tunica intima (též jen intima nebo interna) je vnitřní vrstva, která se skládá z endotelu, který vytváří hladký a vazký povrch lumenu pro přirozené proudění krve. Tloušťka intimy je relativně malá a pro prasečí sestupnou aortu byla stanovena na průměrnou hodnotu 0,3 mm (Peña et al. 2015), což odpovídalo zhruba 19 % průměrné tloušťky stěny. (Holzapfel et al. 2007) našel pro lidskou abdominální aortu velmi podobný výsledek. Průměrná hodnota tloušťky intimy byla 0,29 mm, což opět odpovídalo zhruba 20 % průměrné tloušťky stěny. K poslední zmíněné studii je nutné poznamenat, že všechny vzorky byly bez zjevného tloustnutí intimy; průměrné stáří dárců bylo 48 let.

Je dobře známo, že tloušťka této vrstvy roste s věkem a může, ale nemusí, souviset se stupněm aterosklerózy (Virmani et al. 1991). Obecně se dá napsat, že stárnutí je spojeno se zvětšující se extracelulární matrix. To znamená, že roste relativní množství kolagenu, jsou více rozptýleny hladké svalové buňky, které proliferují (množí se) a infiltrují z medie (Monk a George 2014) a jsou degradovány elastinové membrány.

Obrázek 3 zobrazuje uspořádání dominantních složek extracelulární matrix (kolagenu, elastinu a hladkých svalových buněk) převážně v intimální části. Na snímcích D-E-F je vidět jak jsou všechny složky zarovnané axiálně a přibližně v hloubce 50–100 μm se jejich směry náhle mění o 90° do obvodového směru.



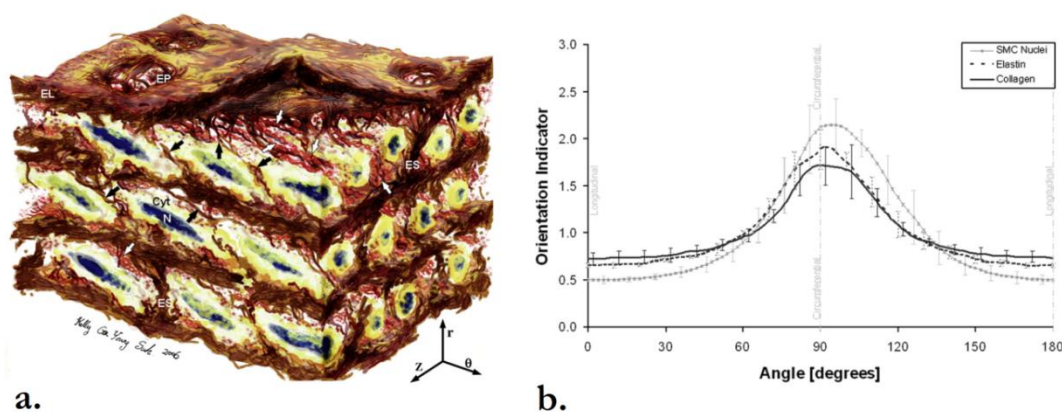
Obrázek 3: Histologické mikrosnímky hovězí společné kyčelní tepny. Mikrosnímky A–C reprezentují obvodový směr, mikrosnímky D–F reprezentují axiální směr. Snímky A a D jsou barveny k zvýraznění hladkých svalových buněk, B a E k zvýraznění elastinu, C a F ke zvýraznění kolagenu. Axiálně orientované komponenty extracelulární matrix jsou patrné v podpovrchových vrstvách intimy, v hloubce cca 50–100 μm dochází k náhlému otočení o 90° a orientaci do obvodového směru. Vzorky jsou v nezatíženém stavu. Černý pruh stupnice zobrazuje 100 μm . Písmeno L symbolizuje zkratku pro Lumen. Převzato z (Timmins et al. 2010).

2.2.2 Tunica media

Tunica media (též jen media) je střední vrstva a je obvykle nejtlustší ze všech tří vrstev arterií elastického typu. Za fyziologických podmínek je obvykle považována za hlavní nosnou vrstvu.

Tloušťka medie byla stanovena od 0,58 mm pro lidskou abdominální aortu (Holzapfel et al. 2007), přes 0,86 mm pro sestupnou aortu (Peña et al. 2015) až po 1,46 mm pro vzestupnou aortu (Peña et al. 2015). V obou zmíněných studiích byla tato tloušťka přibližně 50% z celkové tloušťky stěny aorty.

Tradičně je možné tuto vrstvu charakterizovat také pomocí tzv. mediální lamelární jednotky [medial lamellar unit - MLU] (Wolinsky a Glagov 1967; O'CONNELL et al. 2008). Tato mediální lamelární jednotka je charakterizována jako koncentrované elastické lamely s hladkými svalovými buňkami a kolagenními vlákny mezi nimi, viz Obrázek 4.



Obrázek 4. 3D obrázek mikrostruktury MLU a vyhodnocené hlavní směry všech tří komponent – elastinu, buněk hladkého svalstva a kolagenu. Obrázek (a.) ukazuje MLU. Elastin se zde vyskytuje ve formě elastických lamel či membrán (EL), husté síť mezilamelárních vláken (IEF – černé šipky), elastinových vzpěr (ES) a vyztužených pórů (EP). Buňky hladkého svalstva jsou v podobě vřetenovitých útvarů skládajících se z jader (N) a cytoplasmy (Cyt). Kolagenní vlákna jsou v podobě menších či větších svazků (bílé šipky), které jsou přilehlé k elastickým lamelám. Graf (b.) ukazuje, že všechny tři komponenty jsou orientovány téměř obvodově s jistou mírou rozptýlu. Buňky hladkého svalstva jsou od obvodového směru (tj. 90°) mírně odchýleny o 10°. Rozměry ($\theta \times Z \times r$) jsou $80 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m} \times 45 \mu\text{m}$, lumen nahoře; r určuje radiální směr, z axiální a θ obvodový. Převzato z (O'Connell et al. 2008).

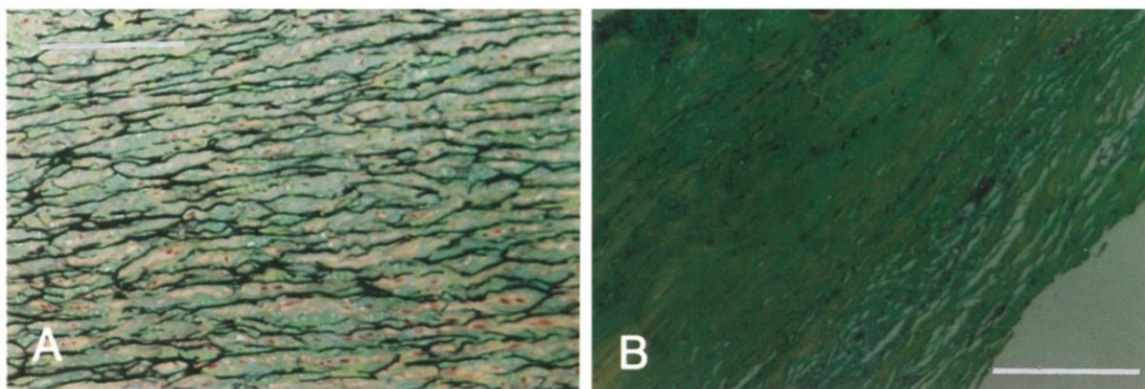
Jednotlivé složky jsou v MLU v tomto přibližném procentuálním zastoupení. U krysích vzorků abdominální aorty elastin představuje ~29 %, hladké svalové buňky ~24 % a kolagen až 47 % (O'Connell et al. 2008). Tyto výsledky souhlasí s dříve publikovanou studií (He a Roach 1994), kde autoři na lidských abdominálních vzorcích změřili ~23 % elastinu, ~23 % hladkých svalových buněk a až 54 % kolagenu.

2.2.3 Tunica adventitia

Tunica adventitia (též jen adventicie nebo externa) je vnější vrstva cévy, která je kontinuálně obklopena perivaskulární (okolní) tkání. Na rozdíl od medie obsahuje fibroblasty, nervy a u aorty také malé krevní kanálky zvané vasa vasorum, viz Obrázek 2. Fibroblasty pomáhají syntetizovat kolagen a krevní kanálky vyživují dodatečně cévu. Tloušťka této vrstvy je přibližně 0,40 mm pro lidskou abdominální aortu (Holzapfel et al. 2007) a 0,55 mm pro sestupnou až 0,67 mm pro vzestupnou část prasečí hrudní aorty (Peña et al. 2015). Adventicie je složena převážně z kolagenních vláken. Za normálních podmínek (normální krevní tlak, bez patologie), je většina těchto vláken zvlněna, viz Obrázek 6. To jinými slovy znamená, že zatížení nese hlavně medie a adventicie (vlákna v ní) zůstala tzv. nezapojená. Díky tomu bývá někdy tato vrstva označována za pevnostní reservoár.

2.3 GLOBÁLNÍ VZHLED TKÁNĚ PŘI AAA PATOLOGII

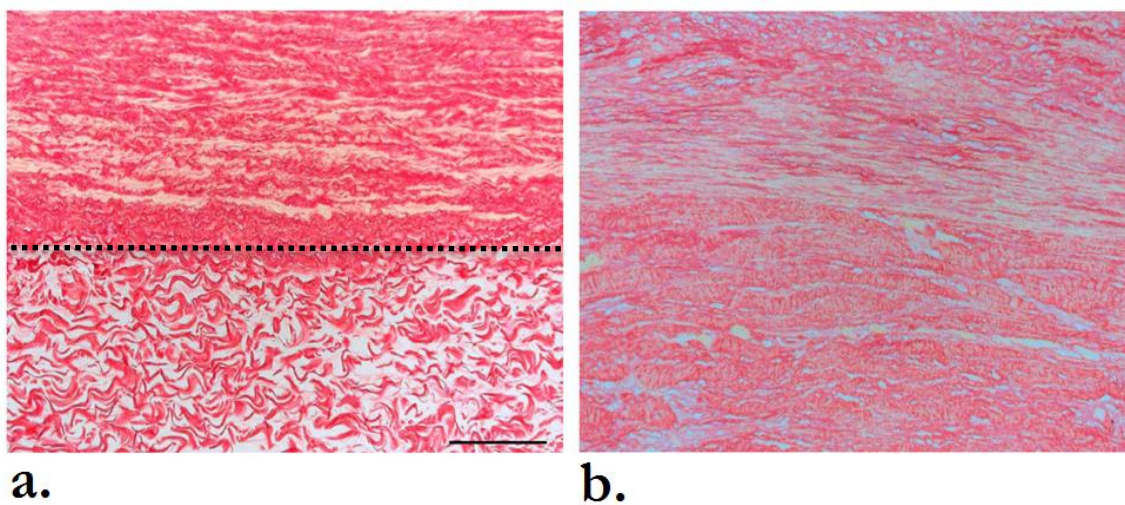
Dříve se předpokládalo, že aneurysma vzniká jako důsledek degenerace tkáně, která měla být podobná jako u aterosklerózy. (Alexander 2004) poukázal na zcela jinou etiologii. Ateroskleróza tepen postihuje primárně intimu, zatímco formace aneurysmat je spojena s primárními (kongenitálními) nebo sekundárními (získanými) změnami v extracelulární matrix především v medii. (He a Roach 1994) porovnali skladbu 8 zdravých a 8 patologických lidských aort a zjistili, že procentuální zastoupení elastinu klesá z ~23 % na ~2,4 %, stejný procentuální úbytek byl vyhodnocen pro buňky hladkého svalstva (z ~23 % na ~2,2 %). Zcela opačně se choval protein kolagen, tzn., že byl pozorován nárůst z ~55 % na ~96 %, viz např. Obrázek 5. Tyto výsledky jsou v souladu i s předchozími studiemi (Campa et al. 1987; Rizzo et al. 1989). Druhové zastoupení typů kolagenu (více viz kapitola 3.1.) zůstává nezměněno u normální a patologické tkáně.



Obrázek 5. Porovnání vzhledu normální a aneurysmatické tkáně. Mikrosnímek (A) ukazuje zdravou tkáň stěny tepny. Mikrosnímek (B) ukazuje aneurysmatickou tkáň. Barveno Movatovým barvivem, které zbarví elastin do černá, hladko-svalové buňky červeně a kolagen slabě nazelenale až žlutě. Měřítko 200 μ m. Převzato z (He a Roach 1994).

U ne-aneurysmatické tkáně můžeme pod mikroskopem poměrně snadno odhadnout, o kterou vrstvu stěny tepny se jedná. Obrázek 6a. ukazuje jasný přechod mezi vrstvou medie a adventicie (viz černá tečkovaná čára). V adventicii jsou vlákna významně zvlněna. Naproti tomu Obrázek 6b., podobně jako Obrázek 5B ukazuje u AAA něco jiného. V důsledku úbytku elastinu a buněk hladkého svalstva došlo k tomu, že zatížení musela převzít kolagenní vlákna v adventicii. Vlákna se tedy v adventicii narovнала a hranice mezi vrstvami vymizela.

To má praktické důsledky i v oblasti experimentu, kde je výhodné zkoušet mechanické vlastnosti jednotlivých vrstev odděleně. Mechanické oddělení probíhá podél elastinových membrán, což je snadné u zdravé aorty, ale téměř nemožné u stěny AAA.



Obrázek 6. Zdravá a aneurysmatická tkáň. Mikrosnímek (a.) zobrazuje zdravou stěnu tepny s vrstvou adventicie v dolní polovině. Stejně orientovaný mikrosnímek (b.) ukazuje aneurysmatickou tkáň. Vzorky byly barveny Picro Sirius Red (PSR) barvivem. Mikrosnímky byly pořízeny za bílého světla. Měřítka neuvedeno. Převzato z (Lindeman et al. 2010).

Zhodnocení:

V kapitole 2 bylo uvedeno stručné lékařské minimum a bylo poukázáno na rozdíly v morfologii zdravé a patologické tepny postižené aneurysmatem. Toto onemocnění souvisí se změnami v extracelulární matrix, jak bylo popsáno výše. Především roste podíl proteinu kolagenu, nahrazujícího ubývající elastin, který má omezenou životnost a v dospělosti se již nevytváří, viz kapitola 3.2.

Z hlediska modelování mechanických vlastností stěny AAA je zřejmé, že kolagen je její nejdůležitější strukturní složkou a proto mu bude věnována ještě samostatná kapitola 3.1.

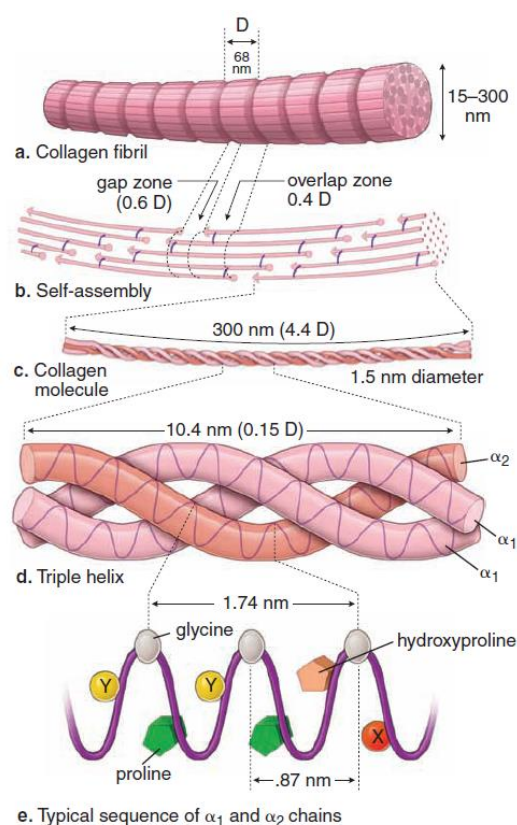
3 MECHANICKÉ VLASTNOSTI TKÁNĚ

3.1 KOLAGEN

Kolagen je nejhojnější protein v těle savců. Do dnešní doby bylo objeveno několik různých typů tohoto proteinu, viz např. (Gelse et al. 2003), ale jen několik z nich, jmenovitě typy I, III, IV, V a VI se vyskytují v tepnách. Kolagen typu I a III v nich tvoří až 90 % z celkového objemu tohoto proteinu. Poměr kolagenu typu I a kolagenu typu III je přibližně 74 % ku 26 %, a ačkoliv procentuální zastoupení kolagenu v případě AAA roste, zmíněný podíl zůstává nezměněn (Rizzo et al. 1989). Kolagen je produkován celý život a je syntetizován hladkými svalovými buňkami v medií a fibroblasty v adventicii. (Nissen et al. 1978) zjistil u krys, že kolagen v aortě a v a. mesenterica (tepna střevní) má poločas rozpadu přibližně 60–70 dní. U hypertenzních zvířat byl poločas rozpadu podstatně kratší a zredukoval se na 17 dnů.

Typické uspořádání jedné fibrily kolagenu zobrazuje Obrázek 7a. Každá fibrila je sestavena z molekul kolagenu. Každá samostatná molekula kolagenu (dříve označováno jako tropokolagen) se skládá ze tří polypeptidů známých jako α řetězce. Tyto α řetězce se vzájemně proplétají a tvoří pravotočivou troj-šroubovici. Každá molekula je kolem 300 nm dlouhá a má kolem 1,5 nm v průměru. Svazek kolagenních fibril tvoří výsledné kolagenní vlákno. Čerstvá kolagenní vlákna jsou bezbarvé prameny o tloušťce od 1 μm do 100 μm , obvykle jsou **vlákna zvlněná** (Ushiki 2002).

(Sherman et al. 2015) analyzoval různé kolagenní struktury a zjistil, že jednoosá tuhost (efektivní modul pružnosti v tahu) klesá se zvětšující se strukturou, tj. 2400–9100 MPa pro jednoduchou molekulu kolagenu, 200–4400 MPa pro fibrilu kolagenu a 30–1570 MPa pro kolagenní vlákno. Pro měkkou tkáň (kůže, mitrální chlopeč, céva, rohovka oka, aj.) se jednoosá tuhost pohybuje maximálně jen do řádu desítek MPa.



Obrázek 7. Obrázek formování jedné fibrily kolagenu.

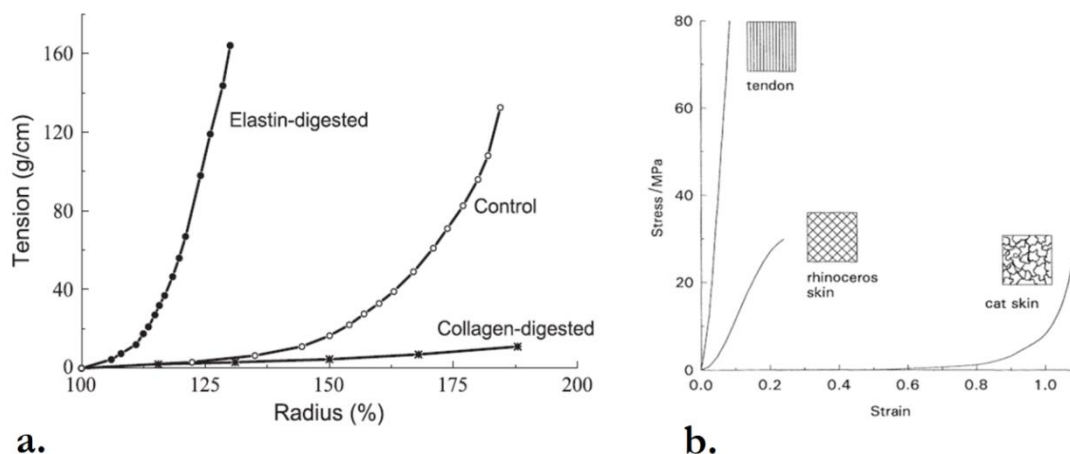
Překlad: Triple helix – troj-šroubovice, gap zone – mezera, overlap zone – překrývající se oblast, self-assembly – vlastní vzájemné spojení, diameter – průměr,

Autor této dizertační práce má dvě hypotézy, jak by výše popsany pokles efektivního modulu pružnosti mohl být vysvětlen:

- a) Čím více vláken je ve struktuře, tím je vyšší pravděpodobnost, že některá z nich mohou být defektní; při zatížení prasknou a sníží celkovou tuhost.
- b) Fibrily mají svoji limitovanou délku a jsou spojeny proteoglykanovou maticí, viz Obrázek 11. Tato matrice je poddajnější a může tak snižovat celkovou tuhost.

Na rozdíl od elastinu, kolagen může být elasticky protažen pouze do $\sim 2\%$ z jeho nezvlněné podoby (Carlisle et al. 2010)⁵.

Kolagen, respektive uspořádání kolagenních vláken, je zodpovědné za typickou nelineární deformačně-napětovou odezvu tkáně tepny ve tvaru písmene „J“, viz Obrázek 8. Tato odezva je známa již více než 100let (Roy 1881), avšak teprve studie (Roach a Burton 1957) demonstrovala, za použití selektivního trávení, vliv hlavních proteinů extracelulární matrix, tedy kolagenu a elastinu.



Obrázek 8. Vliv kolagenu a elastinu na deformačně-napětovou odezvu a ukázka deformačně-napětových křivek pro různé uspořádání kolagenních vláken. Graf (a.) ukazuje průměrnou odezvu 9 kyčelních tepen, když byl selektivně odstraněn kolagen nebo elastin. Převzato z (Fratzl 2008), originál v (Roach a Burton 1957). Graf (b.) ukazuje, jak vypadají deformačně napětové křivky pro různé uspořádání kolagenních vláken. Převzato z (Shadwick et al. 1992).

Překlad: Control – kontrolní vzorek, elastin-digested – vzorek, kde byl tzv. stráven (enzymaticky rozložen) elastin, collagen-digested – vzorek, kde byl stráven kolagen, tendon – šlacha, rhinoceros skin – nosorožčí kůže, cat skin – kočičí kůže.

Obrázek 8a. ukazuje, že jakmile je odstraněn kolagen, počáteční tuhost je přibližně stejná jako u kontrolního vzorku, ale mizí deformační zpevnění; relativně malé zatížení produkuje velkou změnu poloměru. Na druhou stranu, pokud je odstraněn elastin, je vidět silně zpevňující nelineární křivka s dvěma odlišitelnými téměř lineárními oblastmi spojenými tzv. kolenem.

⁵ Autoři testovali kolagen typu I, vytvořeného tzv. elektrospinningem (zvlákňování, spřádání)

Tvar křivek však nezávisí jen na vlastnostech samotného kolagenu, ale i na uspořádání kolagenních vláken, jak demonstruje (Shadwick et al. 1992). Pokud by byla vlákna orientována pouze v jednom směru (jednalo by se o jedno-směrový kompozit), tak jak tomu je například v Achillově šlase, odezva na jednoosé zatížení v tomto směru by byla téměř lineární. Pokud jsou však vlákna různě prostorově orientována a navíc zvlněna, jako v případě kočičí kůže, bude nejprve docházet k postupnému zapojování kolagenních vláken a jejich natažení. Jakmile budou všechna vlákna zapojena, tedy natažena a orientována do směru zatížení, budou opět tvořit přibližně jedno-směrový kompozit a následná odezva bude tedy opět lineární.

3.2 ELASTIN

Na rozdíl od kolagenu, elastin jako protein není produkován celý život, ale jeho produkce končí s dosažením dospělosti (Feldman a Glagov 1971). Poločas rozpadu je mezi 50–70 lety. Urychlení degradace elastinu může být podpořeno špatným životním stylem a různými viry či bakteriemi, jako Chlam. Pneumoniae (Petersen et al. 2001). Z mechanického hlediska je elastin velmi poddajný protein a dosahuje vratného protažení kolem 60 %. Protože se elastin chová při zatížení téměř lineárně, je možné tuto odezvu aproximovat modelem neo-Hook (Gundiah et al. 2009).

Dále bylo zjištěno, že elastin je odpovědný za podstatné podélné předepnutí artérií v jejich in situ pozici (Horný et al. 2016). Vyvolané axiální předpětí má zásadní fyziologickou roli. Minimalizuje změny v axiálním napětí a deformaci během srdečního cyklu a zvětšuje obvodovou roztažnost cév (Horný et al. 2014).

Zdá se také, že určitá míra axiálního předpětí brání lokální ztrátě stability, jinými slovy, chrání cévu od uzavření vlivem jejího zkroucení nebo zalomení při ohybu (Han 2008).

3.3 HLADKÉ SVALOVÉ BUŇKY

Hladké svalové buňky jsou v podobě protáhlých vřetenovitých buněk se zkosenými konci. Jejich délka je různá. Ve stěně cévy je kolem 20 μm , v děloze až 500 μm . Podle studie (O'Connell et al. 2008), jedna mediální lamelární jednotka bez patologie obsahuje až 24 % hladko-svalových buněk. Objem jedné této hladko-svalové buňky je přibližně $1630 \pm 640 \mu\text{m}^3$, sestávající se z $89 \pm 3 \%$ cytoplasmy a $11 \pm 3 \%$ jádra (měřeno na krysích vzorcích).

Hlavní funkcí hladkých svalových buněk v cévách je produkovat extracelulární matrix (Lacolley et al. 2012). Z biomechanického hlediska jsou buňky hladkého svalstva zodpovědné za viskoelastické chování cévní stěny. Buňky jsou, stejně jako vlákna kolagenu spíše v obvodovém směru a jsou mírně protaženy (O'Connell et al. 2008). To může znamenat, že i tyto buňky mohou nést část zatížení.

Zhodnocení:

V kapitole 3 byly popsány mechanické vlastnosti kolagenu, elastinu a hladkých svalových buněk. Dominoval protein kolagenu typu I a III, který se v artériích nachází v podobě kolagenních vláken.

Na základě rešerše bylo usouzeno, že nejdůležitější vlastností pro přesné modelování deformačně napět'ové odezvy arteriální tkáně je poznání uspořádání samotných kolagenních vláken, viz Obrázek 8. Dominantně se jedná o parametry směrové orientace (jaké dominantní směry vlákna zaujímají), disperze (jak jsou vlákna rozptýlena kolem dominantních směrů) a vlnitost (jak významně jsou vlákna zvlněná).

Všechny tyto parametry lze zahrnout do konstitutivních modelů, které odezvu tkáně matematicky popisují – viz kapitola 4. Vzhledem k velkým deformacím měkkých tkání jsou založeny na teorii hyperelasticity.

4 HYPERELASTICKÉ KONSTITUTIVNÍ MODELY

Parametry diskutované v předchozích kapitolách, tedy orientace, disperze a vlnitost je možné zahrnout do konstitutivních vztahů. Hlavním cílem těchto konstitutivních vztahů je poskytnout matematické modely k popisu reálného chování materiálu, tzn. aproximovat skutečné chování materiálu za různých stavů deformace.

Hyperelastické modely postulují existenci funkce energie napjatosti [strain energy density function - SEDF], kterou označme například písmenem W . V současné době jsou některé SEDF založeny čistě na mechanickém testování (jednoosá, dvouosá, inflační a extenční zkouška, atd.) a nerespektují vnitřní strukturu. Tyto modely jsou označeny jako fenomenologické. Další část modelů je tzv. histo-mechanicky motivována, neboli jsou založeny na struktuře tkáně. To znamená, že kromě mechanického testování (které je vždy nutné) byly vzorky taktéž histologicky zpracovány a informace o struktuře byly získány z analýzy mikroskopických snímků.

Je důležité zmínit, že postulátem hyperelasticity se automaticky předpokládá ryze elastické chování materiálu, tedy zanedbávají se veškeré neelastické efekty, jako je například viskoelastické chování nebo vnitřní poškození (Mullinsův efekt).

Starší studie ukazující cévu jako nestlačitelnou ([Lawton 1954](#); [Carew et al. 1968](#)) jsou v současné době hojně diskutovány a ukazuje se, že cévy mohou být mírně stlačitelné ([Skacel a Bursa 2016](#)). Protože však do dnešní doby není zcela rozhodnuto, jestli cévy modelovat jako stlačitelné nebo nestlačitelné, autor této práce preferuje původní a převažující názor o nestlačitelnosti a zápis modelů bude podle toho upraven.

Více informací, které není možné v této práci obsáhnout, lze nalézt v monografii ([Treloar 1975](#)), nebo v knize od editorů ([Kassab a Sacks 2016](#)).

4.1 FENOMENOLOGICKÝ IZOTROPNÍ MODEL YEOH

Ačkoliv O. H. Yeoh navrhl tento model pro elastomery, stal se velmi používaný i v oblasti modelování měkkých tkání. Yeoh začal s upravenou formou 9 parametrického modelu Mooney-Rivlin, která byla převažující v 90. letech, viz (Yeoh 1990, 1993). Následně provedl analýzu plněných a neplněných gum a zjistil, že příspěvek druhého invariantu I_2 deformačního tenzoru k celkové energii napjatosti je velmi malý a může být zanedbán. Výsledná energie napjatosti je tedy funkcí jen prvního invariantu I_1 a má tvar

$$W = \sum_{i=1}^5 C_{i0} (I_1 - 3)^i, \quad (1)$$

kde C_{i0} popisuje napět'ové parametry a I_1 je první invariant Cauchy-Greenova deformačního tenzoru. Je důležité zmínit, že konstanta spojená s nejnižší mocninou ($i=1$) udává míru počáteční tuhosti a s uvážením pouze této první mocniny se z modelu Yeoh stává model Neo-Hooke (viz kapitola 4.2.1). Konstanty u vyšších mocnin určují míru deformačního zpevnění (míru progresivity deformačně-napět'ové závislosti).

(Raghavan a Vorp 2000) použili na výsledky z jednoosých zkoušek AAA, viz (Raghavan et al. 1996), model Yeoh 2. řádu a identifikovali jeho materiálové parametry, viz Tabulka 1 jako model (RV). V současné době je to jeden z nepoužívanějších konstitutivních modelů pro AAA a byl použit i autorem této práce, viz (Novak et al. 2017a, 2017b). Limitací RV modelu je fakt, že model byl získán z jednoosé tahové zkoušky, ačkoliv stěna tepny vykazuje obecně dvouosý stav napjatosti. Predikční schopnost tohoto modelu nebyla v literatuře nikdy analyzována. (Polzer et al. 2013b) identifikoval materiálové parametry stěny AAA z publikovaných biaxiálních zkoušek aneurysmatické tkáně; viz Tabulka 1 jako model (P). Protože surová data testů nebyla dostupná, materiálové parametry byly ve skutečnosti identifikovány z jiné SEDF (Choi a Vito 1990) přes její parametry uvedené v literatuře (Vande Geest et al. 2006a), které byly využity pro výpočtové simulace dvouosých zkoušek. Tento model obsahuje pět parametrů a byl úspěšně použit v novém pravděpodobnostním přístupu k určení rizika ruptury AAA (Polzer et al. 2015a).

Tabulka 1. Materiálové parametry pro konstitutivní model Yeoh. Vyšší konstanty c_{40} a c_{50} použité v modelu P naznačují jeho výraznější deformační zpevnění v porovnání s modelem RV.

Model	c_{10} (kPa)	c_{20} (kPa)	c_{30} (kPa)	c_{40} (kPa)	c_{50} (kPa)
(RV)	177	1881	-	-	-
(P)	5	0	0	2200	13750

⁶ Původní navrhnutý model obsahoval jen tři členy ($n=3$)

4.2 STRUKTURNĚ MOTIVOVANÉ MODELY

Ačkoliv fenomenologických modelů, izotropních i anizotropních, existuje celá řada, do předchozí kapitoly byl vybrán pouze jeden, v současné době nejpoužívanější naším týmem i světově. Dále budou důkladněji diskutovány spíše strukturně motivované modely. Na základě prací (Lanir 1983; Kassab a Sacks 2016) a vlastních zkušeností lze zhodnotit jejich „strukturní motivaci“ a sestavit kritéria pro „dobrý“ model:

Požadované vlastnosti pro „dobrý“ model

Materiálové parametry by měly být jednoznačně určitelné z provedených experimentů a nezávislé na volbě počátečních podmínek nelineární regrese. Tato vlastnost by měla platit nezávisle na typu modelu, tedy jak pro strukturní, tak i fenomenologické modely a nazývá se robustnost modelu.

Model by měl být také validován. Jinými slovy by mělo být ověřeno, že model bude dávat racionální výsledky (jinými slovy: jsou výsledky akceptovatelné?). Dají se zde využít dva soubory dat – kontrolní a validační. Z kontrolního souboru určit průměrnou odezvu a tu porovnat s validační skupinou.

V závěru by se u modelu měly ověřit jeho predikční schopnosti (predikovat odezvu tkáně i mimo rozsah zatěžování nebo v jiných módech zatěžování než obsáhla vstupní data).

Specifika strukturně motivovaných modelů

Strukturně motivovaný model by měl reflektovat morfologické vlastnosti tkáně. Všechny materiálové parametry by měly mít jasný (fyzikální příp. geometrický) význam (tuhost materiálu nebo některé jeho složky, orientace vláken, směrový rozptyl vláken, vlnitost vláken) a parametry spojené se strukturou materiálu by měly být určovány nejen z mechanických zkoušek, ale právě z analýzy obrazu této struktury.

Parametry strukturního modelu cévní tkáně

Na základě kapitoly 3.1 bylo usouzeno, že nejdůležitějšími parametry jsou směrová orientace, disperze vláken kolem této směrové orientace a jejich vlnitost.

4.2.1 Izotropní model Neo-Hooke

Hyperelastický model neo-Hooke je nejjednodušší strukturně motivovaný konstitutivní model, i když často bývá jeho strukturní podstata opomíjena a je k němu přistupováno jako k zvláštnímu případu fenomenologických modelů s polynomickým tvarem SEDF. Jeho strukturní zdůvodnění je založeno na statistické termomechanice náhodně prostorově orientovaných a vzájemně propojených polymerních řetězců. Chování těchto polymerních řetězců je dáno normálním (Gaussovým) rozdělením a v podstatě se mluví o tom, jak se chová spojnice koncových bodů jednoho řetězce (vektor \mathbf{r}) při deformaci. Jakmile je vyvolána deformace tohoto řetězce, řetězec se napřimuje a jeho celková entropie klesá. Pokud se dále uvaží deformace N řetězců charakterizovaná hlavními protaženími ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) a pokud zmíněná spojnice \mathbf{r} mezi koncovými body nikdy nedosáhne maximální protažitelné délky řetězce L ($r \ll nl^7$), může být hustota deformační energie W získána na základě změny Gibbsovy volné energie, ve které dominuje entropie, a to ve tvaru

$$W = \frac{1}{2} NkT(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 - 3), \quad (2)$$

kde k je Boltzmannova konstanta, N počet řetězců v jednotce objemu a T je absolutní teplota. Položením $NkT = \mu$ a použitím Rivlinových invariantů, může být rovnice (2) přepsána do její mnohem známější podoby

$$W = \frac{\mu}{2}(I_1 - 3) = C_1(I_1 - 3), \quad (3)$$

kde $\mu > 0$ je napět'ový parametr a reprezentuje smykový modul pružnosti.

Při velkých deformacích, při kterých se \mathbf{r} blíží délce nl , je Gaussovský model nedostatečný a musí se použít tzv. Langevinova statistika, aby postihla tzv. omezenou (limitovanou) protažitelnost. Například (Arruda a Boyce 1993) odvodily tzv. 8-řetězcový model, kde byla Langevinova statistika využita. Tento navrhnutý 8-řetězcový model je často uvažován jako základní model (má jen dva materiálové parametry) k ostatním modelům gumy. Bohužel není vhodný k popisu deformačně-napět'ového stavu tepny, neboť není schopný popsat velmi ostré deformační zpevnění.

Podle nejlepších znalostí autora této dizertační práce, nebyl model Neo-Hooke nikdy použit jako model materiálu pro stěnu tepny nebo stěnu AAA a v dalších modelech se vyskytuje jen jako izotropní část energie napjatosti W představující lineární odezvu elastinu (matrice) za velkých deformací.

⁷ Výraz nl představuje celkovou délku řetězce L . Řetězec je tvořen n segmenty, každý o jmenovité délce l .

4.2.2 Anizotropní modely materiálu

Holzapfel 2000 (Holzapfel – Gasser – Ogden)

Tento anizotropní model, někdy zkráceně označen jako HGO, byl poprvé představen na přelomu tisíciletí (Holzapfel et al. 2000), ačkoliv mnohem sofistikovanější modely byly představeny již téměř o 20 let dříve (Lanir 1983). Snad pro svoji jednoduchost se model HGO stal nejpoužívanějším a uvedená reference nejcitovanějším⁸ článkem zabývajícím se mechanikou stěny tepny. Tento model se skládá z izotropní části popisující modelem neo-Hooke (kap. 4.2.1) nekolagenní matici a z anizotropní části, sestávající ze dvou mechanicky ekvivalentních rodin výztužných kolagenních vláken orientovaných ve dvou směrech symetrických podle obvodového, resp. axiálního směru tepny. Energie napjatosti je dána v následujícím tvaru

$$W = \frac{\mu}{2}(I_1 - 3) + \frac{k_1}{2k_2} \sum_{i=4,6} (e^{k_2(I_i-1)^2} - 1), \quad (4)$$

kde $k_1 > 0$ je napět'ový parametr, spojený s tuhostí vláken a $k_2 > 0$ je bezrozměrný parametr se vztahem k jejich deformačnímu zpevnění. Anizotropii popisují invarianty I_4 a I_6 . Oba tyto invarianty vyjadřují protažení obou rodin vláken a mohou být vyjádřeny v podobě hlavních protažení, tedy jako $I_4 = \lambda_1^2 \cos^2 \varphi_1 + \lambda_2^2 \sin^2 \varphi_1$ a $I_6 = \lambda_1^2 \cos^2 \varphi_2 + \lambda_2^2 \sin^2 \varphi_2$, kde φ_i jsou úhly směrů vláken v obvodově-axiální rovině (viz Obrázek 17). Pro symetrickou orientaci obou rodin vláken orientaci platí $\varphi_1 = \varphi$ a $\varphi_2 = -\varphi$.

Holzapfel 2005

O pět let později, (Holzapfel et al. 2005) navrhl vylepšený model, kde kromě dvou rodin kolagenních vláken, přibyl ještě parametr ϱ díky kterému se dosahuje nenulového zpevnění i mimo dominantní směry vláken. Energie napjatostí je prezentována v podobě

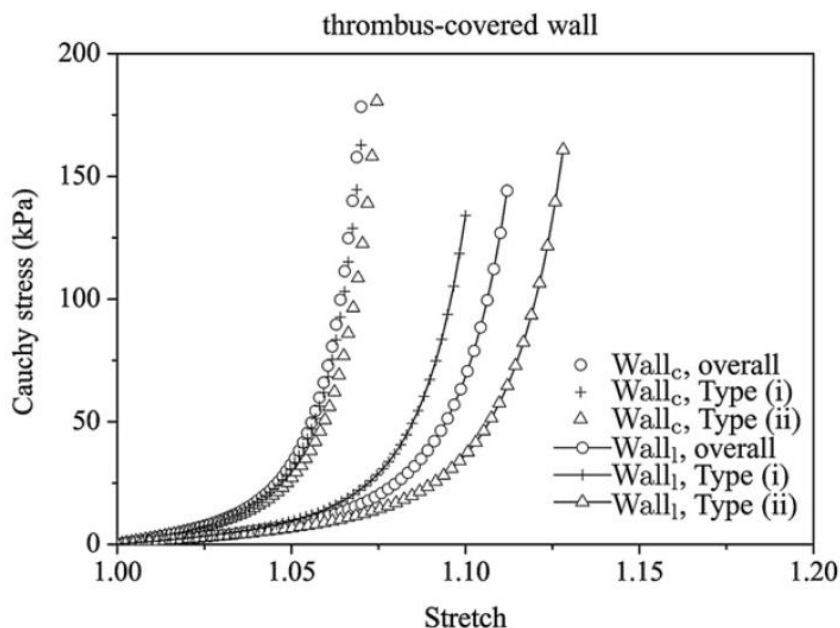
$$W = \frac{\mu}{2}(I_1 - 3) + \frac{k_1}{2k_2} \sum_{i=4,6} (e^{k_2[(1-\varrho)(I_i-3)^2 + \varrho(I_i-1)^2]} - 1), \quad (5)$$

kde ϱ je tedy bezrozměrný parametr a je vnímán jako váhový faktor nabývající hodnot $\varrho \in \langle 0 \div 1 \rangle$.

⁸ kolem 2337 citací v únoru v roce 2018

Hodnota 1 znamená přechod zpět k energii napjatosti popsané rovnicí (4) zatímco 0 vede k izotropní odezvě a energie napjatosti je podobná energii napjatosti uvedené v (Demiray 1972).

K tomuto modelu materiálu jsou uvedeny níže zmíněné studie, kde je možné nalézt materiálové parametry pro různé typy tkání. Například materiálové parametry prasečí hrudní aorty je možné nalézt v (Peña et al. 2015). Zajímavější studií, zaměřenou na lidské AAA, je (Tong et al. 2011). Ve studii lze nalézt materiálové parametry pro stěnu AAA, která byla přikryta různými typy ILT, tzv. mladým (typ i) a starým (typ ii)⁹. Jinými slovy, je tedy zřejmé, že stěna AAA má jinou mechanickou odezvu (především v podélném směru, viz Obrázek 9) podle stáří ILT. Protože je ve studii uvedeno i srovnání mezi jednotlivými typy ILT a jejich tloušťkou, bylo by možné vlastnosti stěny AAA nastavit podle tloušťky samotného ILT. Podle nejlepších znalostí autora této dizertační práce toho však nebylo nikdy využito.



Obrázek 9. Obvodová a podélná biaxiální odezva AAA tkáně v podobě skutečné napětí – protažení. Indexy c a l určují obvodový [circumferential] a podélný [longitudinal] směr. Typ (i) znamená, že stěna byla pokryta „mladým“ ILT a typ (ii) znamená, že stěna byla pokryta „starým“ ILT. Stěna pokrytá starším trombem je z mechanického hlediska slabší a vykazuje vyšší anizotropii především ve vyšších oblastech zatížení. Převzato z (Tong et al. 2011).

Překlad: Wall – stěna, thrombus-covered wall – stěna přikrytá trombem, Cauchy stress – skutečné napětí, stretch – protažení

⁹ Různé dělení ILT podle jeho stáří, stejně tak definování jednotlivých vrstev ILT je mimo rozsah této práce, základní informace podává právě studie (Tong et al. 2011) a reference v ní.

Poznámky k doposud uvedeným anizotropním „strukturně motivovaným“ modelům

Je důležité zmínit, že ačkoliv výše zmíněné konstitutivní modely patří k nejcitovanějším modelům a jejich autoři tvrdí, že vychází ze struktury tkáně, jiní vědci s tím nesouhlasí, viz např. (Peña et al. 2015). Stejně tak podle autora této dizertační práce jsou modely Holzapfel 2000 a Holzapfel 2005 spíše fenomenologické, protože materiálové parametry k_1 , k_2 , q nemají žádný histologický význam a dokonce ani samotné úhly φ_1 , φ_2 často nebývají určeny z histologie.

Konstitutivní model zavádějící strukturní parametr κ (který lze již z histologie získat), popisující směrový rozptyl kolagenních vláken je navržený ve studii (Gasser et al. 2006) a je diskutován níže.

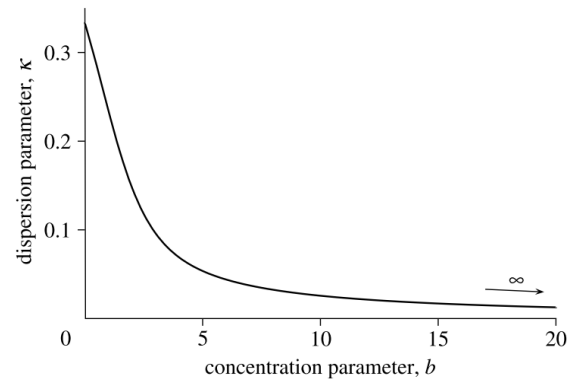
Gasser 2006

Tento model byl navrhnut v literatuře (Gasser et al. 2006). Energie napjatosti je tradičně složena z elastické matrice a dvou rodin kolagenních vláken, jejichž rozptyl kolem středního směru je dán von Misesovou distribuční funkcí. Samotná disperze kolagenních vláken je dána parametrem disperze kappa „ κ ”. Navrhnutá funkce energie napjatosti je dána tvarem

$$W = \frac{\mu}{2}(I_1 - 3) + \frac{k_1}{2k_2} \sum_{i=4,6} (e^{k_2[\kappa I_1 + (1-3\kappa)I_i - 1]^2} - 1), \quad (6)$$

Ačkoliv parametr disperze $\kappa \in \langle 0 \div 1/3 \rangle$ vypadá jako parametr získatelný z analýzy histologických vzorků, musí být ve skutečnosti přepočítán z parametru koncentrace b z von Misesovy distribuční funkce. Parametr b nabývá jakýchkoli kladných hodnot. Pokud se parametr b blíží nule (a parametr $\kappa \rightarrow 1/3$), jedná se o izotropní chování. Naopak pro $b > 0$ se jedná o anizotropní chování. Pokud by parametr koncentrace b dosáhl nekonečna

(tedy parametr disperze κ nuly), kolagenní vlákna by byla orientována v jednom směru bez disperze. V tomto případě rovnice (6) přechází na rovnici (4).



Obrázek 10. Vztah mezi disperzním parametrem κ a mezi parametrem koncentrace b von Misesovy distribuční funkce. Převzato z (Gasser et al. 2006)

Aby tato sekce byla kompletní, je nutné rozepsat zmiňovaný parametr koncentrace b , který se vyskytuje jako jeden z parametrů definujících tzv. von Misesovu distribuční funkci. Pokud se omezíme na popis orientace kolagenních vláken v rovině (viz kapitola 7.1.1), pak von Misesova funkce má předpis

$$\varrho(x) = \frac{e^{b \cos(x-\varphi)}}{2\pi I_0(b)} \quad 0 \leq x < 2\pi \quad 0 \leq b < \infty. \quad (7.1)$$

Podle rozsahu proměnné x je zřejmé, že se tato funkce také někdy nazývá distribuční funkcí na (jednotkové) kružnici. Parametr φ tedy definuje (kruhový) střed¹⁰, kolem kterého je funkce koncentrována (jak široce) a parametr b udává tuto koncentraci (míru směrového rozptylu).

¹⁰ Jedná se zkrátka o střední hodnotu

Dále $I_0(b)$ reprezentuje Besselovu funkci prvního druhu, nultého řádu a je dána vztahem

$$I_0(b) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{b \cos(A-\varphi)} dA. \quad (7.2)$$

Pokud by cévy vykazovaly dominantně dva směry (dvě rodiny kolagenních vláken s jistou mírou rozptylu), je nutné zkombinovat dvě distribuční funkce do jedné (Schriebl et al. 2012a), pokud by céva vykazovala čtyři rodiny vláken, je nutné zkombinovat čtyři distribuční funkce (Rezakhaniha et al. 2012). Kombinace se provádí na základě principu superpozice a normování vůči jedničce (pravděpodobnost).

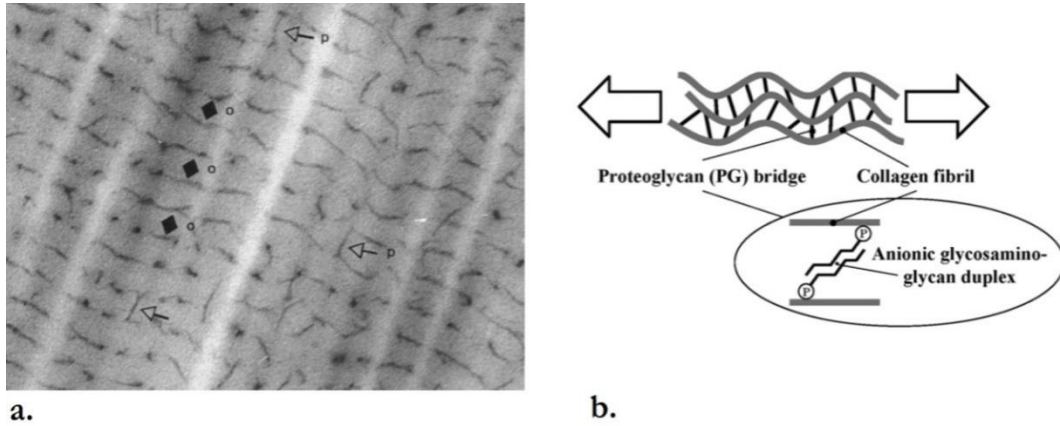
Nedostatky modelu Gasser

Nejdůležitější inovací tohoto modelu je zavedení tzv. zobecněného strukturního tenzoru který parametr κ obsahuje, namísto provedení úhlové integrace navrhnuté již dávno předtím (Lanir 1983). Tento zjednodušený způsob je numericky velmi efektivní a umožňuje realizaci výpočtů v časech srovnatelných s jednodušším modelem HGO. Vypočtené výsledky se však mohou od výsledků získaných přes úhlovou integraci lišit tím více, čím větší je rozptyl vláken; pro izotropní rozdělení vláken až o 100 % (Cortes et al. 2010).

Model Gasser 2006 sice zohledňuje směrový rozptyl vláken, pokud je velmi malý, ale není schopen postihnout postupné zapojování původně zvlněných kolagenních vláken při zvyšujícím se zatížení, tento efekt popisuje fenomenologicky pomocí exponenciální funkce podobně jako starší modely (HGO). Postupné zapojování kolagenních vláken při rostoucí deformaci bylo zavedeno v modelu (Martufi a Gasser 2011), který je diskutován dále.

Martufi-Gasser model 2011

(Martufi a Gasser 2011) navrhli model, který jistým způsobem propojuje mikrouroveň (fibrily a vlákna) s makrourovní (stěna jako kontinuum) a vychází z představy o tom, jak se chovají původně zvlněné kolagenní fibrily (vlákna) za zvyšující se deformace, viz kapitola 3.1. Kolagenní vlákna se tedy skládají ze svazků kolagenních fibril, které jsou vzájemně propojeny proteoglykanovými můstky, viz Obrázek 11.



Obrázek 11. Vzájemně propojené fibrily pomocí proteoglykanových můstků. Mikrosnímek (a.) ukazuje proteoglykanové můstky propojené ortogonálně (o, označeny černými kosočtverci) a paralelně (p, označeny šipkami) s kolagenními fibrilami (světlejší pásy běžící z horní do spodní části. Zvětšení (110 000×); pořízeno elektronovým mikroskopem. Převzato z (Scott 1988). Obrázek (b.) ukazuje idealizovanou vizi tohoto vzájemného propojení fibril a proteoglykanových můstků. Převzato z (Martufi a Gasser 2011).

Překlad: proteoglycan bridge – proteoglykanový můstek, collagen fibril – kolagenní fibrila, anionicglycosaminoglycan duplex – aniontový glykosaminoglykanový duplex

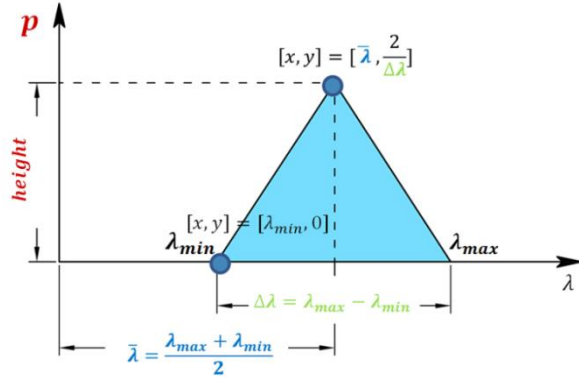
Po aplikaci zatížení (předpokládá se prostý tah) se aktivují vnitřní změny, tj. zapojování kolagenních fibril – vláken. Zapojování těchto kolagenních vláken zahrnuje jejich postupné natažení do směru zatížení a napřimování původně zvlněných vláken. Jakmile dosáhne první kolagenní vlákno protažení λ_{min} začíná nést zatížení a dochází k ukládání elastické energie jak do vláken samotných, tak do proteoglykanové matrice mezi těmito vlákny. Pokud uvážíme, že stěna cévy je nestlačitelná, pak pro orientovaná vlákna ve směru zatížení lze psát

$$\frac{\partial \psi}{\partial I_4} = \frac{1}{2\lambda^2} \sigma(\lambda), \quad (8)$$

kde I_4 je (pseudo) invariant reprezentující kvadrát protažení vlákna (λ^2) a σ je (skutečné) Cauchyho napětí vlákna.

K popisu postupného zapojení kolagenních vláken, jak bylo uvedeno výše, byl navržen následující, po částech spojitý, konstitutivní model vycházející z trojúhelníkové distribuční funkce vlnitosti, viz Obrázek 12.

Tato distribuční funkce byla zvolena jako jedna z nejjednodušších funkcí (po částech lineární), která je řešitelná analyticky v uzavřeném tvaru a také z toho důvodu, že v literatuře neexistovaly (a podle nejlepších znalostí autora této dizertační práce stále ještě neexistují) žádné podrobnější informace o skutečném rozložení vlnitosti.



Obrázek 12. Trojúhelníková distribuční funkce s vyznačenými veličinami λ_{max} , λ_{min} , $\bar{\lambda}$, $\Delta\lambda$. Význam jednotlivých veličin je patrný přímo z obrázku.

Pokud se provede první integrace tohoto trojúhelníkového rozdělení, je možné získat kumulativní distribuční funkci (KDF). Integrace této KDF vede na po částech spojitou odezvu kolagenních vláken, danou níže uvedenými vztahy

$$\sigma(\lambda) = \begin{cases} 0 & 0 < \lambda \leq \lambda_{min} \\ \frac{2k}{3\Delta\lambda^2} \lambda (\lambda - \lambda_{min})^3, & \lambda_{min} < \lambda < \bar{\lambda} \\ k \lambda \left[\lambda - \frac{2(\lambda - \lambda_{max})^3}{3\Delta\lambda^2} - \bar{\lambda} \right], & \bar{\lambda} < \lambda < \lambda_{max} \\ k \lambda (\lambda - \bar{\lambda}), & \lambda_{max} < \lambda < \infty \end{cases} \quad (9)$$

kde k představuje tuhost vlákna a λ jeho protažení. Význam $\Delta\lambda$, λ_{min} a λ_{max} viz Obrázek 12. Rovnice (9) vykazuje typickou nelineární odezvu pozorovanou u měkkých tkání – viz Obrázek 8 v kapitole 3.1. Celková energie napjatosti může být zapsána jako

$$W = \frac{\mu}{2} (I_1 - 3) + \int_{\omega} \varrho \psi d\varpi, \quad (10)$$

kde první člen je reprezentován modelem Neo-Hooke s parametrem $\mu > 0$ popisující počáteční smykovou tuhost matrice (elastin). Druhý člen reprezentuje odezvu kolagenních vláken. Parametr ϱ představuje distribuční funkci popsanou rovnicemi (7.1) a (7.2) a celková odezva je integrována přes jednotkovou kouli, jak navrhl (Lanir 1983).

Zhodnocení

V kapitole 4.2 bylo uvedeno několik konstitutivních modelů pro popis deformačně napět'ové závislosti (zdravé i patologické) stěny tepny. Mimo prostou definici vztahů bylo uvedeno i omezení jednotlivých modelů.

Základní otázka však zní následovně: „Je jedno, který konstitutivní vztah použiji ve výpočtovém modelu?“. Stručný rozbor této otázky bude proveden v následující kapitole.

4.3 VLIV KONSTITUTIVNÍHO MODELU NA NAPĚTÍ V AAA

Jak bylo zmíněno již v úvodu práce (viz str. 13), posouzení rizikovosti AAA je ovlivněno mnoha faktory, které mohou být v daném výpočtovém modelu zahrnuty. V současné době však stále chybí hlubší diskuse nad modelem materiálu stěny tepny nebo AAA. Na předchozí otázku se tak nedá jednoznačně odpovědět a problematika bude nastíněna právě v této kapitole a v kapitole 9 bude provedena srovnávací analýza výsledných hodnot napětí u klinicky relevantní skupiny 70 AAA za použití dvou odlišných modelů materiálů.

V současné době tedy existují dva protichůdné názory:

- a) Model materiálu je důležitý a je důležité jej zlepšovat (Polzer et al. 2013b, 2015).
- b) Model materiálu není důležitý (Zelaya et al. 2014; Joldes et al. 2016); lze vybrat model extrémně tuhý bez znalosti struktury tkáně

Autor této dizertační práce si myslí, že zastínění modelu materiálu je pravděpodobně dáno historicky užitím Laplaceovy rovnice:

$$\sigma_t = \frac{p r}{t}, \quad (11)$$

kde p je tlak, r je (deformovaný) poloměr a t je (deformovaná) tloušťka stěny. V této nejpoužívanější teorii se parametr materiálu opravdu nevyskytuje. Jedná se však o teorii založenou na předpokladu membránové napjatosti a předpokládající rovněž, že aorta je kruhově symetrická „nádoba“ s konstantní tloušťkou stěny a nepříliš proměnnou křivostí. Tento předpoklad však může být pro různé tvary AA ale zejména pro AAA porušen ze dvou důvodů:

1. Obecná geometrie nemá konstantní tloušťku stěny, jak dokumentoval (Kazi et al. 2003; Di Martino et al. 2006; Raghavan et al. 2006; Martufi et al. 2015). Uvážení proměnné tloušťky může vést ke zcela rozdílným výsledkům napětí (Raut et al. 2013).

To je pravděpodobně dáno tím, že v místech odlišných svojí tuhostí (rozdílný materiál, tloušťka) mohou vznikat přídavné ohybové momenty, které způsobují lokální nárůst napětí porušující předpoklad membránové napjatosti (konstantní po tloušťce stěny). Tuto analogii lze nalézt i v klasické mechanice v napojení např. polokulového dna na válcový plášť tlakové nádoby. Pokud jsou tuhosti (tloušťky nebo materiály) obou částí stejné, žádné ohybové napětí nemůže vzniknout. Pokud jsou však odlišné, ohybové napětí lokálně zvyšuje celkovou napjatost.

2. Ve stěně AAA nemusí být membránová napjatost, protože vlivem lokálně proměnné křivosti dochází k významným ohybovým efektům, které opět lokálně zvyšují napjatost.

Dalším podstatným argumentem proti používání extrémně tuhého modelu materiálu je fakt, že hypotéza o nedůležitosti modelu materiálu byla testována u velmi malého počtu případů, tedy jen na třech geometriích (Joldes et al. 2016) nebo dokonce jen na jedné geometrii (Zelaya et al. 2014). Závěry z těchto studií tak nelze zobecňovat pro použití v klinické praxi.

Pokud je současným trendem určování rizika ruptury pomocí výpočtového modelování, dílčí model materiálu může být pro nezanedbatelnou skupinu pacientů významný. Jeho absence může vést buď k umělému podhodnocení anebo nadhodnocení (Polzer et al. 2013b) rizika ruptury, což je pro pacienta vždy nebezpečné. V případě podhodnocení rizika by došlo k oddálení zákroku, který by však byl ve skutečnosti nutný. Naopak v případě nadhodnocení rizika je zase pacient zbytečně vystaven operaci, která je ve věkové skupině >65 let spojena s významným rizikem úmrtí (viz kapitola 8).

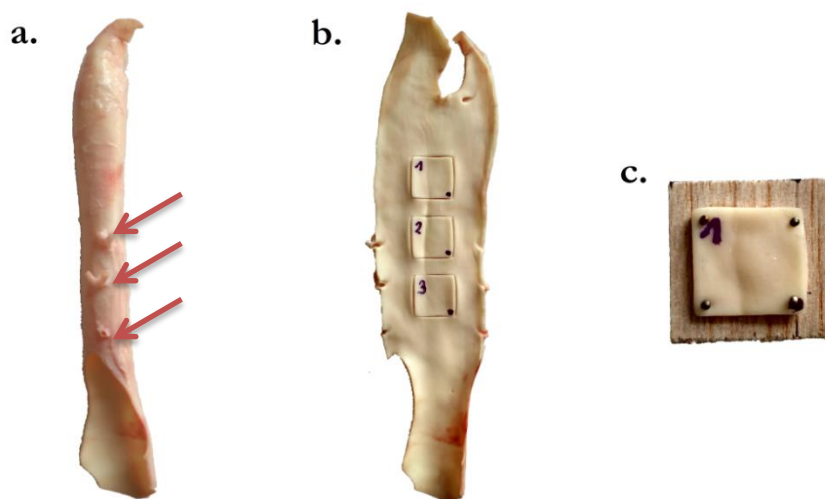
Ačkoliv je tedy téma dizertační práce formulováno jako téma základního výzkumu orientace kolagenních vláken v tkáních tepen, praktický dopad na klinickou praxi, např. na věrohodnost predikce ruptury AAA, přímo závisí na významnosti vlivu použitého konstitutivního modelu tkáně při výpočtovém modelování. Pokud by tomu tak nebylo, je zpochybněn praktický aplikační význam znalosti uspořádání kolagenních vláken v cévní stěně. Proto i tato otázka bude v práci analyzována, viz kapitola 9.

5 PŘÍPRAVA VZORKŮ A HISTOLOGIE

V kapitole 4.2.2. byl proveden rozbor anizotropních strukturně motivovaných konstitutivních modelů. Jak získat strukturní parametry, které do modelu vstupují, bude uvedeno v této a další kapitole.

Základem je histologický proces¹¹, kterého bylo vždy využito v publikovaných článcích (Polzer et al. 2013a, 2015b; Novak et al. 2015). Všechny dále uvedené kroky, kromě řezání na Mikrotomu a samotného barvení byly zajištěny autorem této dizertační práce. Řezání a barvení vzorků bylo provedeno ve spolupráci s II. Ústavem Patologie a Anatomie při fakultní nemocnici U sv. Anny, Brno. Ačkoliv se jedná již o vlastní práci autora, pro přehlednost je zařazena do rešeršní části práce, tedy na toto místo.

Z jatek Steinhauser byly dovezeny segmenty prasečí aorty. Stáří prasete bylo ~10 měsíců, váha ~105-120 kg. Tyto segmenty byly očištěny od okolní perivaskulární tkáně, viz Obrázek 13a. Dále byl segment aorty podélně rozříznut na posteriorní (zadní) straně. Čtvercové vzorky 18×18 mm byly vyseknuty speciálním vykrajovacím nožem z anteriorní (přední) strany a byly označeny číslem a tečkou v pravém dolním rohu kvůli identifikaci hlavních směrů, viz Obrázek 13b. Následně byly tyto vzorky připíchnuty na papírovou překližku čtyřmi špendlíky (bez zjevné deformace) a ponořeny do 10% formaldehydu k zafixování, viz Obrázek 13c.



Obrázek 13. Postup přípravy vzorku. Snímek (a.) ukazuje segment prasečí hrudní aorty. Červenými šipkami jsou označeny odbočující tepny. Snímek (b.) symbolizuje stejný segment, který byl podélně rozříznut. Na rozříznutém segmentu byly náhodně vybrány tři úseky, ze kterých byly vyseknuty čtvercové vzorky speciálním vysekávacím nožem. Snímek (c.) ukazuje připíchnutý vzorek na balsu (modelářskou překližku).

¹¹Histologie je disciplína zabývající se studiem mikroskopické struktury živočišné tkáně (či rostlinných pletiv). Histopatologie se zabývá poruchami (onemocněními) na úrovni mikroskopických struktur.

Vedle vzorků prasečí tepny byly použity i vzorky prasečí Achillovy šlachy. Příprava vzorků na histologii probíhala stejným způsobem.

Cílem fixace je potlačení autolýzy (procesu rozkladu tkáně) a možného množení bakterií, jakož i stabilizace tvaru vzorku. Obecně se udává, že jakmile jsou vzorky zafixovány, neměly by již měnit svůj tvar během jakéhokoliv následného procesu ([Suvarna a Bancroft](#)). Nejpoužívanější fixativa jsou aldehydy zahrnující formaldehyd, glutaraldehyd, glyoxal, atp. Penetrace fixativa do tkáně se řídí vztahem

$$d = K\sqrt{t}, \quad (12)$$

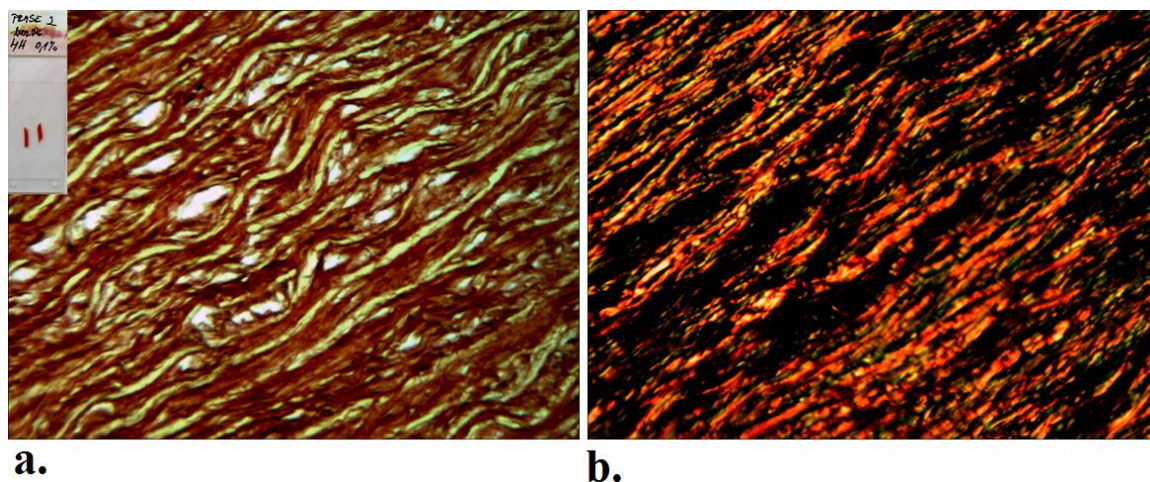
kde K je koeficient difuzivity specifického fixativa, t je čas ([Medawar 1947](#)). V našem případě se každý vzorek ponechal ve formaldehydu nejméně 24 hodin. Ačkoliv je známo, že formaldehyd může denaturovat proteiny (blíže neurčeným způsobem mění jejich strukturu), udává se jen nepatrná změna vnějšího projevu, tj. změna objemu. Vliv fixativa proto není v práci dále analyzován.

Pro klasickou mikroskopii, kde světlo prochází vzorkem je nutné fixované vzorky nařezat na histologické řezy s tloušťkou 5 - 7 μm . Vzorky jsou řezány pomocí speciálního přístroje - Mikrotomu. Všechny nařezané vzorky určené k mikroskopickému pozorování jsou pak barveny specifickými barvivy k zvýraznění vyšetřovaných proteinů a hladkých svalových buněk. Kolagen vykazuje přirozenou dvojlomnost, která vzniká pravděpodobně v důsledku vnitřní stavby kolagenních vláken ([Wolman a Kasten 1986](#)) a barvením pomocí barviva Picro Sirius Red¹² (PSR) se zvýrazňuje nejméně 7 \times ([Junqueira et al. 1979](#)).

Optická dvojlomnost materiálu se dá vysvětlit poměrně jednoduchým způsobem. Je dobře známo, že některé průhledné krystaly, tj. křemen, kalcit, rutil, turmalín aj. jsou opticky anizotropní, mají tedy index lomu různý v různých směrech, což definuje vlastnost známou jako dvojlomnost. Pokud se tedy například na libovolný znak napsaný na papíře podíváme např. přes krystal kalcitu, uvidíme jej 2 \times . Samotný krystal se dá označit za opticky dvojlomný. Podstatou je zde rozdělení paprsku světla na dva fázově posunuté paprsky – řádný a mimořádný. Detailněji bude tato vlastnost rozebrána pod kapitolou [6.1.1](#).

¹²Ačkoliv se PSR barvivo může koupit jako „kit“, histologové si barvivo míchali vždy sami na základě vlastních zkušeností

Kromě dvojlomnosti je barvením zvýrazněna i fluorescence (Dolber a Spach 1993). S výhodou lze tedy použít polarizační nebo fluorescenční mikroskopy, které zaručují, že bude pozorován jen kolagen a nic jiného. Na rozdíl od způsobu pozorování pomocí bílého světla, který se taktéž může použít (Polzer et al. 2015b), se kolagenní vlákna v polarizovaném světle jeví intenzivněji a ostatní struktury či zbylá tkáň a díry jsou tmavé. Kolagenní vlákna mohou mít pod polarizovaným světlem odlišnou barvu měnící se od zelené přes oranžovou k červené (viz Obrázek 14b) podle toho, jak roste tloušťka vláken (Rich a Whittaker 2005) a vlákna jsou těsněji uspořádána (Dayan et al. 1989). Při pozorování pomocí bílého světla se vlákna jeví spíše hnědě (viz Obrázek 14a).



Obrázek 14 Mikrosnímky histologických vzorků barvených PSR. Mikrosnímek (a.) zobrazuje pozorovanou tkáň za bílého světla. Kolagenní vlákna se jeví hnědě, elastin je nažloutlý a díry jsou bílé. Mikrosnímek (b.) zobrazuje stejnou tkáň pod polarizovaným světlem. Kolagenní vlákna se zde jeví převážně jako oranžová až červená, elastin a díry jsou tmavé. Mikrosnímky pochází z obvodového směru a byly natočeny pod 45°. Zvětšení 400×.

V posledních letech se objevilo nové bakteriální barvivo s označením CNA35-OG488, které se výborně váže na kolagen (Krahn et al. 2006). S tímto barvivem bylo dosaženo ve spojení s multi-fotonovou mikroskopií úctyhodných výsledků. Barvivo dokázalo penetrovat napříč tloušťkou stěny tepny a vlákna byla vizualizována do hloubky 100 μm (ze strany adventicie) bez nutnosti histologického řezání (Rezakhaniha et al. 2012; Schrauwen et al. 2012). Bohužel první složka CNA35 tohoto barviva není komerčně dostupná a tak je téměř nemožné napodobit citované studie. I kdyby však barvivo dostupné bylo, bylo by zapotřebí spolupráce s biochemickou laboratoří, neboť CNA35 je složka získávaná z bakterie e-coli.

6 VIZUALIZACE TKÁNĚ

V kapitole 3.1 byl zevrubně popsán kolagen, respektive kolagenní vlákna a jejich vliv na mechanickou odezvu tkáně. V předchozí kapitole 5 byl zase popsán způsob, jak si obstarat vzorek a proč a jak je nutné kolagen v něm připravit na vizualizaci. Jednalo se zatím o invazivní zásah. Základní otázkou tedy ještě zůstává, zda existují i jiné možnosti jak vizualizovat měkkou tkáň a základní strukturní složky v ní.

U všech způsobů vizualizace je nejdůležitější (prostorové) rozlišení, které v podstatě určuje jak „ostře“ bude analyzovaný obraz vypadat. U počítačové tomografie – angiografie [computer-tomography-angiography, CT-A], magnetické rezonance [magnetic resonance imaging – MRI] a jejich mikro provedení je prostorové rozlišení definováno pomocí velikosti voxelu. Jedná se o 3D kvádr s rozdílným rozlišením v různých směrech, většinou nejhorším ve směru kolmém na řez snímku. Bohužel, klasické CT-A nebo MRI, které se používají v medicíně (aktuálně 1,5–3 Tesla u MRI) dosahují rozlišení přibližně v řádech odpovídajících tloušťce stěny tepny (Groen et al. 2010; Van Reeth et al. 2012).

V současné době se proto stále používají histologické preparáty ve spojení s jejich mikroskopickým pozorováním, jehož rozlišitelnost je nesrovnatelně lepší. Tento způsob je nejpoužívanější, ačkoliv je známo, že zejména u menších vzorků může dojít k lokálnímu porušení tkáně, kterou je pak nutné zpětně rekonstruovat (například potrhání fibrózní čepičky u aterosklerotické tepny, různé ohnutí, atp.).

6.1 OPTICKÁ MIKROSKOPIE

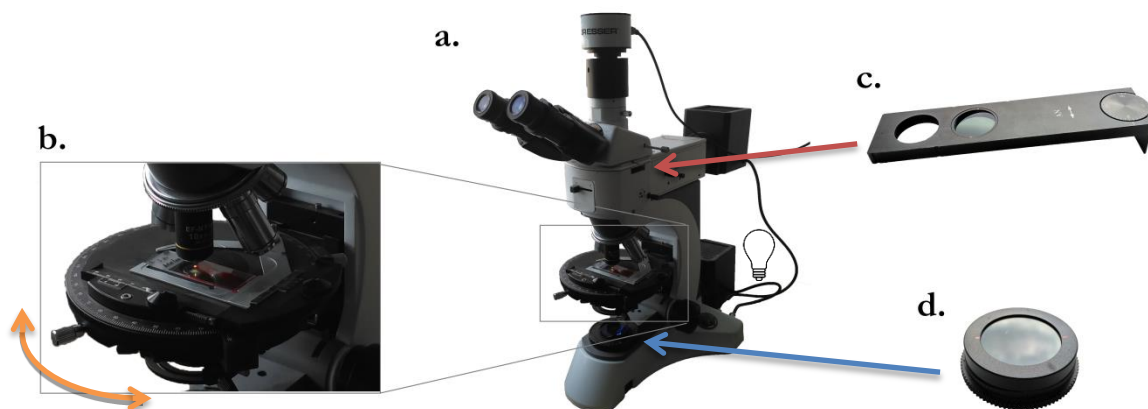
Klasická optická mikroskopie je považována za „zlatý standard“ mezi všemi metodami. Pod pojmem „klasická“ je myšleno pozorování za bílého světla (nepolarizované světlo) a pod polarizovaným světlem. Tato mikroskopie je relativně levná a výsledky jsou srovnatelné s novějšími technikami, jako jsou elektronová či multi-fotonová mikroskopie, malouhlové rozptylové metody SALS [small angle light scattering] a SAXS [small angle X-rays scattering].

Na tomto místě je nutné upozornit na fakt, že ačkoliv se pro snímání dají použít i novější metody, získané obrazy se musí analyzovat nezávisle na tom, jaká technika byla použita. K analýze se přitom používají převážně stejné algoritmy. Například ve studii (Tsamis et al. 2013) autoři použili poměrně sofistikovanou multifotonovou mikroskopii, ale získané snímky byly vyhodnoceny pomocí algoritmu, který byl navržen mnohem dříve, viz (Karlson et al. 1998).

6.1.1 Mikroskopické vybavení

Pro analýzu vnitřní struktury tkáně je využit univerzální trinokulární mikroskop Padim, Drexx, s.r.o., viz Obrázek 15a, který umožňuje pozorovat vzorky v procházejícím i odraženém světle (má dvě lampy).

Výhodou tohoto mikroskopu je, že umožňuje pozorovat vzorky jak pomocí bílého světla, tak pomocí lineárně polarizovaného světla. Má však dvě konstrukční nevýhody. Zaprvé neumožňuje namontovat čtvrt-vlnové destičky ke změně lineárně polarizovaného světla na kruhově polarizované¹³ a zadruhé mezi stolem a objektivy je malý prostor, takže se nedá využít univerzální otočný stůl¹⁴. Celkové zvětšení $50\times$ – $1600\times$. Numerická apertura N.A.¹⁵ je přibližně 1,25. K mikroskopu byl dokoupen rotační stůl Padim, Drexx, s.r.o. a 5MPx mikrokamera Bresser Optik, GmbH. Maximální rozlišení je 2592×1944 px se vzorkovací frekvencí 15 snímků za sekundu.



Obrázek 15. Univerzální mikroskop Padim a jeho hlavní části. Snímek (a.) představuje samotný mikroskop. Snímek (b.) otočný stůl s připevněným vzorkem, nad kterým jsou objektivy. Snímek (c.) a (d.) jsou dva filtry – analyzátor a polarizátor. Šipky ukazují jejich pozici v mikroskopu

Mikroskop je vybaven dvěma filtry, tj. polarizátorem a analyzátozem. Polarizátor je umístěn ve světelné cestě (ose) před vzorkem. Analyzátor je umístěn ve stejné světelné cestě mezi objektivem a okulárem (či portem kamery). Oba filtry jsou otočné, sklo analyzátoru je navíc zešíkmené, což nebývá obvyklé.

¹³ Kruhově polarizované světlo způsobí, že je opticky dvojlomný materiál vidět při každém úhlu natočení stolu – není zde problém s periodicitou 90° .

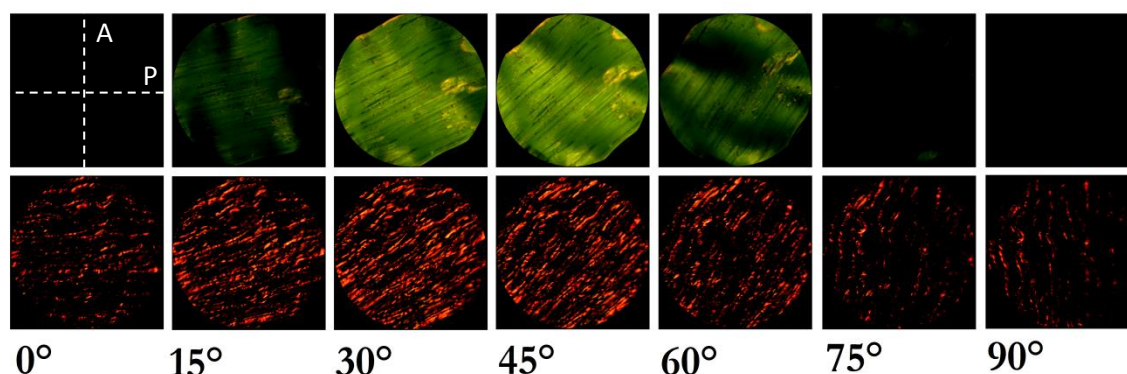
¹⁴ Univerzální otočný stůl slouží pro určení směru kolagenního vlákna v prostoru. Nejedná se o zásadní omezení - 3D orientace se dá získat z 2x 2D (vzájemné složení dvou kolmých rovin).

¹⁵ Numerická apertura je parametr určující, jak kvalitní je mikroskop. Čím vyšší N.A., tím lepší rozlišitelnost.

6.1.2 Princip polarizované mikroskopie

Polarizační mikroskop (Obrázek 15) je určen k pozorování vzorků, které jsou viditelné primárně díky jejich optickým anizotropním vlastnostem, tj. vykazují dvojlomnost, viz již kapitola 5. Fyzikální princip bude vysvětlen nyní.

Světlo vycházející z lampy kmitá z principu elektromagnetického vlnění vždy kolmo na směr šíření, ale ve všech směrech, tedy neuspořádaně, chaoticky. První filtr ve světelné cestě, polarizátor, propouští jen tu část světla, jehož vektor elektrické intenzity kmitá pouze v jednom směru a zbytek světla je pohlcen. Světlo následně vstupuje do vzorku. V případě kolagenních vláken se jedná o anizotropní strukturu. To způsobí, že se polarizované světlo rozdělí na dva paprsky, tzv. řádný a mimořádný. Paprsky jsou vůči sobě fázově posunuty. Po průchodu světla analyzátozem dochází k interferenci světla těchto dvou paprsků do stejné roviny kmitu a obraz se pak v objektivu jeví jako světlý (či tmavý – záleží na natočení vzorku) na tmavém pozadí. Grafický popis poskytuje Obrázek 16.



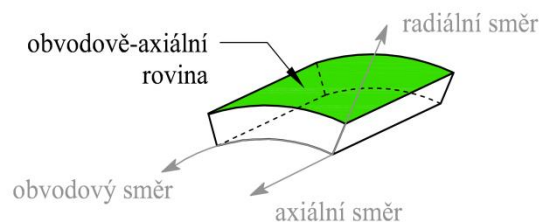
Obrázek 16. Změna intenzity „opticky anizotropní struktury“ v závislosti na natočení této struktury vůči polarizátoru a analyzátoru. Mikronímky v horní řadě odpovídají napřímeným kolagenním vláknům z Achillovy šlachy, mikrosnímky ve spodní řadě odpovídají kolagenním vláknům v praseči aorty (tunica media). Snímky jsou pořízeny v rozestupu 15°, od nuly do 90°. Na prvním snímku vlevo nahoře jsou schématicky zobrazeny filtry – polarizátor P a analyzátor A. Pokud jsou kolagenní vlákna orientována ve směru polarizátoru nebo analyzátoru, světelný paprsek nikdy přes tyto dva filtry neprojde. Při kterémkoliv jiném uspořádání se struktura jeví světle. Vzorek by měl dosáhnout maximální intenzity při 45°.

Z výše uvedeného obrázku je zřejmé, že intenzita světla, která je vidět v objektivu, se mění s periodou 90° (při vzájemně kolmo zkřížených filtrech). Vlákná jsou tmavá při 0°, 90°, 180°, 270° a znovu při 360°. Vlákná jsou naopak světlá při 45°, 135°, 225° a 315°. Čtenáři si tak mohou lehce představit nevýhodu lineárně polarizovaného světla – je nemožné rozlišit směr např. 45° od směru 135° (intenzita je v těchto daných směrech stejná – maximální). Jistou nápravu představuje použití čtvrt-vlnových destiček – viz 15. poznámka pod čarou, str.41 nebo přenastavení analyzátoru u mikroskopu tak, aby nesvíral s polarizátorem 90°, viz kapitola 12.

7 USPOŘÁDÁNÍ KOLAGENNÍCH VLÁKEN VE STĚNĚ TEPNY

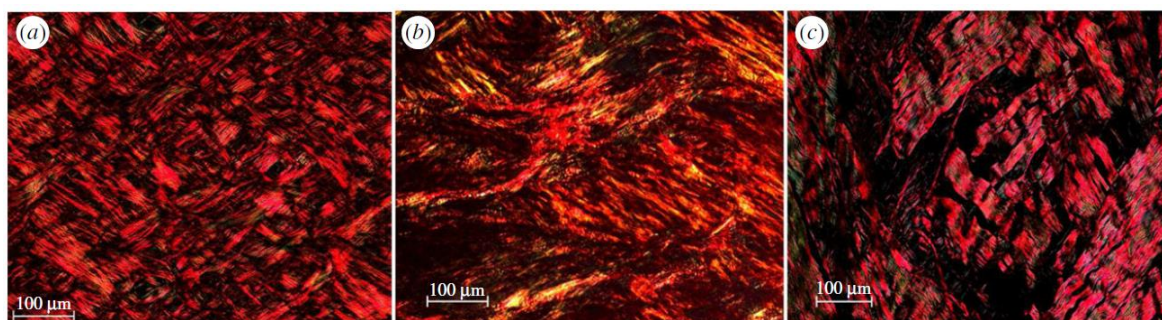
7.1 DOMINANTNÍ SMĚRY A ROZPTYL KOLAGENNÍCH VLÁKEN

Informace o orientaci kolagenních vláken v artériích jsou velmi nekonzistentní, jak bude sumarizováno níže. Měření probíhá zpravidla v obvodově axiální rovině (lze nazvat i rovinou radiální v případě, pokud rovinu určíme její normálou).



Obrázek 17. Vyseknutý vzorek tkáně s naznačenými směry a obvodově-axiální rovinou.

Jedna z prvních měření provedl (Smith et al. 1981) na lidských mozkových artériích pomocí polarizované mikroskopie. Uvedená studie analyzuje kolagenní vlákna v adventicii. Kolagenní vlákna jsou podle zmíněné studie orientována obvodově s jistým procentuálním zastoupením vláken v axiálním směru v nejsvrchnější části. (Finlay et al. 1995) provádí podobnou analýzu a dostává zcela jiné výsledky. Vlákna jsou podle této studie orientována v adventicii spíše axiálně avšak s velkou směrovou disperzí (spíše díky vlnitosti), v medii jsou vlákna orientována téměř čistě v obvodovém směru s minimální disperzí, minimální část vláken je orientována diagonálně. (Holzapfel et al. 2000) zavádí předpoklad o dvou rodinách kolagenních vláken, které jsou orientovány v každé vrstvě pod obecným úhlem symetricky k obvodovému směru, viz Obrázek 18, a vytváří tak dvě protisměrná šroubovicová vinutí. Tento předpoklad byl histologicky podložen až mnohem později, bohužel jen jednou a na tomtéž pracovišti (Schriebl et al. 2012c). Na druhou stranu stejný autor (Schriebl et al. 2012b) ve stejném roce za použití konfokální mikroskopie u „opticky vyčištěného“ lidského vzorku abdominální aorty, získal odlišné výsledky. U vrstvy adventicie potvrdil dvě rodiny kolagenních vláken. V medii však našel jen jednu rodinu vláken orientovanou obvodově a v intimě byly výsledky nejednoznačné.

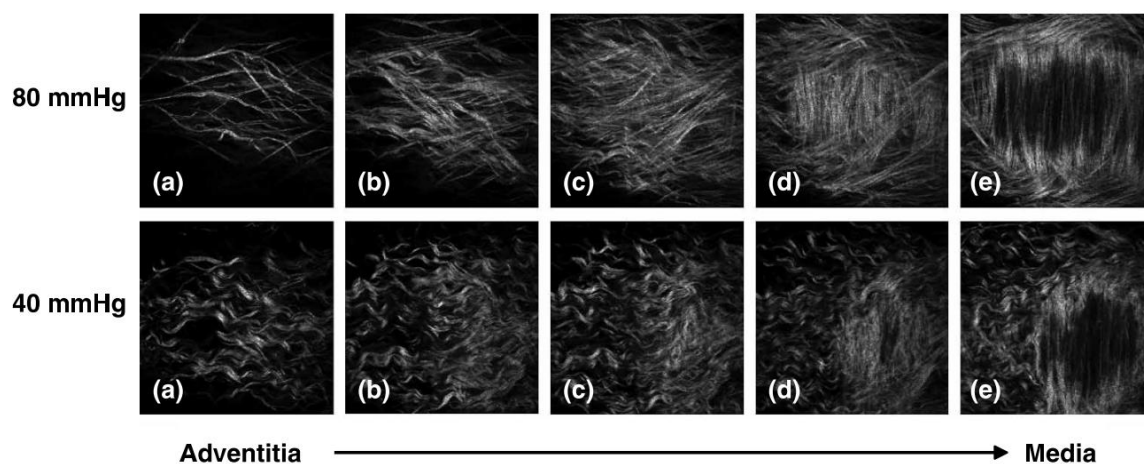


Obrázek 18. Mikrosnímky z jednotlivých vrstev cévy ukazující dvě rodiny kolagenních vláken. (a) intima, (b) medie, (c) adventicie. Barveno PSR. Při vizualizaci byla použita čtvrt-vlnová destička ke změně lineárně polarizovaného světla na kruhově polarizované světlo. Převzato z (Schriebl et al. 2012c)

Myšlenku o dvou rodinách kolagenních vláken taktéž vyvrací (O'Connell et al. 2008), který nachází vlákna v medii u (krysí) abdominální aorty dominantně v obvodovém směru s větší disperzí, viz Obrázek 4b.

Navzdory všem histologickým zjištěním (Baek et al. 2007) zavádí fenomenologický model, ve kterém se vyskytují 4 rodiny kolagenních vláken (obvodově, axiálně a 2x diagonálně), ačkoliv opět chybí histologická motivace takového uspořádání. (Wicker et al. 2008) analyzuje lidskou bazilární arterii od adventicie k medii a výsledky jsou velmi podobné studii (Finlay et al. 1995). V adventicii jsou vlákna orientována axiálně s výraznou vlnitostí a následuje prudký přechod do obvodového směru ve vrstvě medie. Kromě toho autoři nachází i nezanedbatelnou část vláken orientovaných v adventicii diagonálně, jak by měl dokládat Obrázek 19. Bohužel podle autora této dizertační práce zde není jednoznačně jasné, zda jsou vlákna opravdu orientována diagonálně, nebo zda jsou jen významně zvlněna a při určování jejich směru je detekována vzestupná a sestupná část vlny, která by se snadno mohla s diagonální orientací zaměnit. Čtyři rodiny kolagenních vláken histologicky dokládá i (Rezakhaniha et al. 2012) u vzorků adventicie z karotidy u novozélandského králíka.

Jednu z nejnovějších studií publikuje (Sáez et al. 2016), který analyzuje vzorky prasečí společné karotidy s výsledkem obvodově uspořádaných vláken bez zjištění přítomnosti jakýchkoli dalších rodin kolagenních vláken.



Obrázek 19. Orientace kolagenních vláken v bazilární arterii. Mikrosnímky (a)-(e) ukazují plynulý přechod od adventicie k medii pro dvě různá zatížení, tj. 40 a 80 mmHg. Vlákná jsou v adventicii významně zvlněna a orientována axiálně (horizontální hrana obrázku), v medii se orientace mění na obvodovou (vertikální hrana obrázku). Z obrázků, alespoň podle autora této dizertační práce, neplyne diagonální orientace, spíše se jedná o vlnitost, kterou dokumentuje i rozdíl mezi snímkami pro různou velikost zatížení. Převzato z (Wicker et al. 2008).

Zhodnocení

V kapitole 7.1, na základě analyzované literatury, je zřejmé, že pro dominantní orientaci kolagenních vláken v cévách neexistuje jasný závěr. Rozdíly mohou být dány typem cév, nebo samotným způsobem analýzy, tj. zda jsou snímky zpracovány manuálně (výsledky jsou vždy ovlivněny operátorem) nebo automaticky (problém s kalibrací algoritmů viz kapitola 7.1.2).

7.1.1 Rovinná vs. prostorová orientace

Kolagenní vlákna nejsou ve stěně cévy orientována jen v rovině 5–7 μm tlustého řezu, ale vykazují jistou disperzi do radiálního směru. Prakticky lze tedy vyhodnotit dva úhly popisující směr vlákna. V rovině (obvykle obvodově-axiální) se jedná o tzv. azimutální úhel, v prostoru se pak připojuje tzv. elevační úhel definující odchylku od této roviny. Z literatury je zřejmé, že azimutální úhel nabývá vždy hodnot 0° – 180° , zatímco pro elevační úhel platí rozmezí 0° – 90° , ale prakticky se k horní mezi tohoto intervalu zdaleka nepřibližuje (Gasser et al. 2012; Schrauwen et al. 2012; Schriebl et al. 2012c).

Obecně se udává, že k vyhodnocení prostorové orientace je potřebný buď polarizační mikroskop a tzv. univerzální rotační stůl, se kterým je možné otáčet nejen v rovině, ale i v prostoru nebo speciální multifotonový mikroskop se skenovacím stolem a speciální barvivo. Autor této dizertační práce by rád ještě vyzvedl možnost kombinovat vzorky (min. dva) ve dvou vzájemně kolmých rovinách. Jednalo by se stále o analýzu obrazu v rovinách, ale při vzájemné kombinaci by mohla vzniknout třídimensionální distribuční závislost. Podle nejlepších znalostí autora této dizertační nebyla podobná analýza zatím provedena.

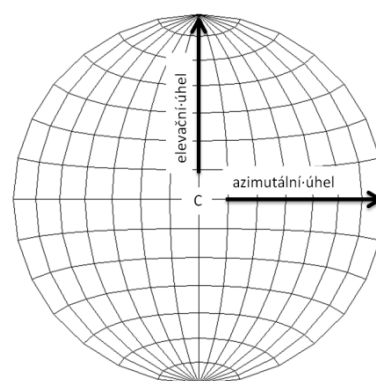
Zhodnocení

Ačkoliv je polarizační mikroskop na ústavu mechaniky těles dostupný, rotační stůl nelze k mikroskopu namontovat díky nedostačenému prostoru mezi revolverovou hlavou pro objektivy a vzorkem. Pořízení multifotonového mikroskopu je zase mimo finanční možnosti našeho pracoviště. Protože by navíc prostorovou závislost šlo získat kombinací orientací ve dvou vzájemně kolmých rovinách, bude se tato práce zabývat orientací kolagenních vláken výhradně v rovině.

7.1.2 Analýza způsobů měření orientace

Manuální měření

Pro určení orientace vláken se dříve ale i dnes stále využívá polarizovaná mikroskopie, univerzální rotační přístroj a záznam do tzv. Lambertovy projekční roviny (Smith et al. 1981; CANHAM et al. 1989; Canham et al. 1991, 1997; Finlay et al. 1995; Sáez et al. 2016). Podstata je následující. Vzorek je umístěn na univerzální rotační stůl a přikryt skleněnou hemisférou. Směry části vláken jsou reprezentovány body, které jsou pak v objektivu viditelné jako body na skleněné hemisféře. Bod na ní je dán azimutálním a elevačním úhlem. Pro další práci je však nutné body transformovat do roviny přes tzv. Lambertovu projekci. Lambertova projekce, viz Obrázek 20, tak vlastně převádí informace o 3D poloze bodů na polokouli do roviny.

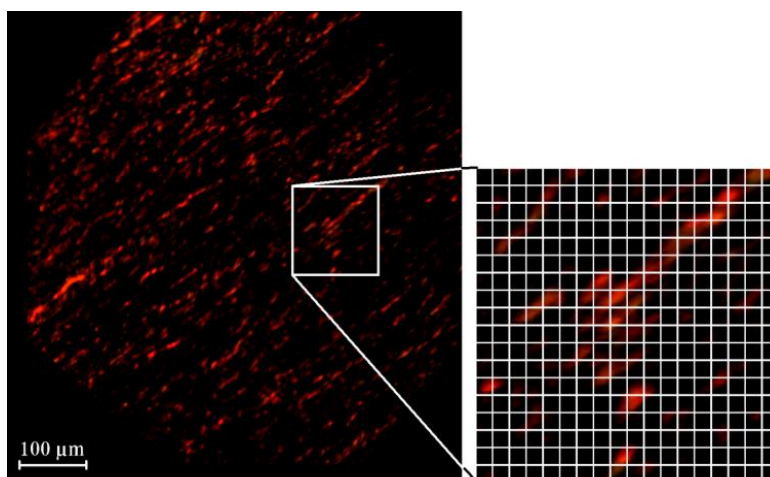


Obrázek 20. Lambertova projekční rovina. Bod C reprezentuje dokonalé obvodové zarovnání, vodorovná osa disperzi do axiálního směru, svislá do radiálního.

Orientace v Lambertově rovině je následující. Azimutální úhel je dán horizontální osou, elevační úhel je dán vertikální osou. Střed této roviny je dosažen tehdy, když azimutální a elevační úhly jsou rovny 0; střed mimo jiné značí (při vhodné transformaci), že jsou vlákna orientována čistě v obvodovém směru. Koncentrace kolem středu pak značí menší či větší disperzi směrů vláken jak v rovině, tak v prostoru. Pokud by se napravo či nalevo od středu tvořily shluky bodů, znamenalo by to, že jsou vlákna orientována spíše diagonálně, jak předpokládá (Holzapfel et al. 2000). Naopak shluky bodů podél vertikální osy mohou značit nenulový elevační úhel, tedy odchylku od obvodově-axiální roviny, příp. detekci vzestupné a sestupné části (prostorově) zvlněného kolagenního vlákna.

Pokud je použit výše zmíněný postup, většinou je analyzováno pouhých několik desítek bodů na jeden histologický řez; tedy např. ~60 (Smith et al. 1981), ~16 (Finlay et al. 1995), ~30 (Sáez et al. 2016), ~50 (Schrieffer et al. 2012c) a ~36 (Gasser et al. 2012). Za bod se považuje dostatečně velký pixelový výsek, který nese informaci o globální orientaci vlákna. Při mém měření se jako nejsnázeji detekovatelný výsek ukázal 10×10 px, viz Obrázek 21. Tyto body se vybírají náhodně, ale rovnoměrně z celého mikroskopického snímku.

Zpravidla je měření pro jednoho člověka velmi namáhavé, protože musí pozorovat daný bod při natáčení stolu do polohy jeho „vyhasnutí“ a následně zaznamenat úhel natočení rotačního stolu. Stůl pak musí otočit zpět a pozorovat další bod. Po přibližně 50 měřeních operátor ztrácí koncentraci, proto často měření probíhá ve dvou lidech. Manuální měření je tedy velmi složité a časově náročné.



Obrázek 21. Obrázek ukazuje vytvořenou síť na mikrosnímku aortální tkáně. Ačkoliv je síť vytvořena v celém obrázku 960×960 px s velikostí bodu 10×10 px. Pro přehlednost byl vybrán jen malý výsek.

(Schriebl et al. 2012c) navíc upozorňuje na dvě další potenciální omezení, ačkoliv se v odborných knihách nevyskytují:

1. Obrázek 21 ukazuje, že kolagenní vlákna mají různou intenzitu. Operátor tedy zpravidla může být přitahován k jasnějším bodům a ty méně jasné ignorovat. To může vést k podhodnocení skutečné disperze vláken, ignorování nebo naopak určení více dominantních směrů, které ale v tkáni ve skutečnosti nejsou.
2. Je prakticky velmi složité navrhnout pro Univerzální rotační stůl podobnou pomocnou síť jako na obrázku 21 a operátor může úhly zaznamenat nesprávně. Chyba, která vznikla u měření 17 vzorků jedním operátorem, který měřil 2× stejné body, byla vyhodnocena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu s průměrnou hodnotou $r=0,85$ (směr. odchylka 0,15), viz (Gasser et al. 2012). Metoda je tedy závislá na operátorovi.

Zhodnocení manuálního měření

Na základě výše provedené rešerše můžeme tvrdit, že důležitým parametrem pro přesné stanovení orientace a odlišení disperze od vlnitosti je množství analyzovaných bodů na mikrosnímku a množství mikrosnímků jako takových. Autor této dizertační práce se domnívá, že analýza řádově desítek bodů nemůže ani kvalitativně popsat strukturu kolagenu a je proto nutné prozkoumat metodu polarizované mikroskopie a navrhnout změny, které by umožnily analyzovat podstatně více bodů každého mikrosnímku (viz kapitola 11 a 12).

Automatické měření

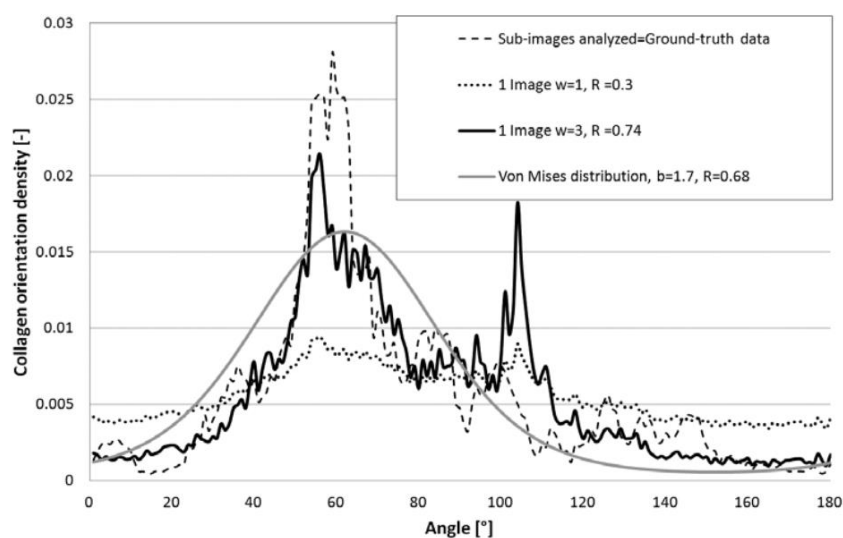
Druhou možností jak prakticky analyzovat 2D orientaci kolagenních vláken, je pomocí vhodně zvoleného algoritmu použitého na nepolarizované mikrosnímky. (Karlson et al. 1998) jako jeden z prvních analyzuje tři způsoby měření hlavních směrů a disperze myofibril. Zjišťuje, že jím převzaté a upravené algoritmy, tj. Houghova transformace a Gradientní algoritmus, jsou velmi rychlé (cca 640 automatických měření za cca 2minuty vůči 20 manuálním měření za stejný čas) a přesné (statisticky nevýznamné rozdíly mezi očekávaným a vypočteným hlavním směrem) a mohou tedy být objektivními náhradami za manuální měření. Takovýchto algoritmů byla vyvinuta ještě celá řada, tj. gradientní (Elbischger et al. 2004), detekující vrcholy a údolí (D'Amore et al. 2010), detekující momenty (Reuzé et al. 1993). Jen málokterý však byl vícekrát použit, nebo validován.

Mezi v současné době nejpoužívanějších algoritmy patří 2D Rychlá Fourierova Transformace [2D Fast Fourier Transformation = FFT]. Tento algoritmus byl shledán jako jeden z nejrychlejších a nejpresnějších (Sander a Barocas 2009). Základní problém v použití algoritmu byl však následující. Algoritmus uměl detekovat dominantní směr (Ayres et al. 2008; Sander a Barocas 2009; Schriebl et al. 2012a), avšak nebyl schopný věrohodně popsat disperzi vláken kolem tohoto směru. Jinými slovy, pokud jsou použity běžné mikroskopické snímky pořízené pomocí bílého světla, bude algoritmus analyzovat i pozadí - šum. Ten je však nutné eliminovat. Na tento problém jako první upozornil (Polzer et al. 2013a), ačkoliv nejasnosti s disperzí jsou patrné i jinde – obr. 1 v (Xu et al. 2011) a obr. 3 v (Ayres et al. 2008). Pro objasnění problému byl vytvořen následující postup. Byl vytvořen umělý obrázek obsahující 56 % čar skloněných pod 40° a 44 % čar skloněných pod 60°. Po provedení FFT byl vytvořen normalizovaný histogram četností úhlů $h(\alpha)$. Histogram obsahoval dva vrcholy skutečně pro úhly 40° a 60° (kvalitativní informace).

Nicméně i pro ideální obraz bez jakéhokoliv šumu, histogram nesl informaci jen o 16 % a 25 % čar místo skutečných 56 % a 44 % (kvantitativní informace). K překonání této nedokonalosti navrhl můj školitel-specialista Stanislav Polzer, PhD umocnění původního histogramu exponentem w^{16} podle vztahu $s(\alpha) = h^w(\alpha)$. Exponent $w > 1$ závisí na kvalitě snímku, na světelné konfiguraci kamery a hlavně na samotné struktuře, která má být analyzována, včetně např. obarvení vzorku. Nelze jej volit libovolně, protože například příliš vysoké w může potlačovat i podstatné informace.

¹⁶ Ačkoliv znak exponentu je nešťastně shodný s parametrem vlnitosti, je ponechán s ohledem na originální zdroje.

K analýze skutečného histologického obrazu byl navržen následující způsob vyhodnocení parametru w . Nejprve byl pomocí FFT analyzován snímek jako celek (zvětšen na čtverec, aby byla analyzována větší část). Poté byl stejný snímek nasnímán po částech znovu při větším zvětšení. Vzniklo tak několik stovek detailnějších snímků a každý z nich byl znovu analyzován pomocí FFT a lokální směry uloženy. Následně došlo k porovnání histogramů původního obrazu s etalonem (analýza více snímků má preferenci správnosti) a kalibraci parametru w tak, aby hodnoty Pearsonova koeficientu a koeficientu determinace byly maximalizovány. Celkový výsledek uvádí Obrázek 22.



Obrázek 22. Histogram četností úhlů určující orientaci kolagenních vláken v cévě. Tečkovaně je zobrazena distribuce směrů kolagenních vláken pouze z jednoho obrázku a porovnána přes koeficient korelace s etalonem (sub-obrázková analýza). Maximální shody $R^2=0,74$ bylo dosaženo umocněním (a znovu normalizací) původního histogramu mocninou $w=3$. Závěrem byl histogram proložen distribuční funkcí von Mises s parametrem koncentrace $b=1,7$ s koeficientem determinace $R^2=0,68$. Převzato z (Polzer et al. 2013a).

Překlad: collagen orientation density – hustota pravděpodobnosti pro jednostupňové rozmezí úhlu kolagenních vláken, angle – úhel od zvoleného směru, sub-images analyzed = ground-truth data – obraz byl analyzován po sub-snímčích = byl vytvořen etalon, image – snímek, von Mises distribution – rozdělení von Mises.

Zhodnocení automatického měření

Na základě výše uvedeného textu je zřejmé, že algoritmus FFT byl podroben kritické analýze, značně vylepšen a bude dále preferován před ostatními algoritmy a v práci dále využit, viz kapitola 10.

Výhodou FFT algoritmu je i to, že bývá často naprogramován v matematických programech a operátor ho může velmi rychle použít bez nutnosti programovat vlastní kód.

7.2 VLNITOST KOLAGENNÍCH VLÁKEN

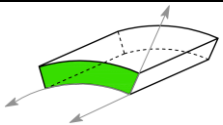
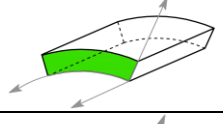
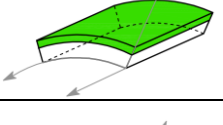
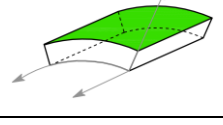
Jak již bylo ukázáno v kapitole 3.1, kolagenní vlákna jsou za normálních okolností zvlněná a při vzrůstajícím tlaku v tepně se postupně začínají zapojovat do přenosu zatížení. Měření vlnitosti probíhá zpravidla ručně tak, že si operátor vybere určitý úsek zvlněného vlákna, který je schopný přesně „obtáhnout“ a zjistit jeho délku, např. L_f . Následně jsou spojeny koncové body vlákna a délka spojnice je opět zaznamenána, např. L_o .

Rozlišuje se parametr vlnitosti, např. w [waviness] (Wolinsky a Glagov 1964; Sokolis 2008) a parametr přímosti P_s [straightness parameter] (Roy et al. 2010; Rezakhaniha et al. 2012; Schrauwen et al. 2012), který je jeho převrácenou hodnotou. Pro vlnitost tedy platí vztah

$$w = \frac{L_f}{L_o}. \quad (13)$$

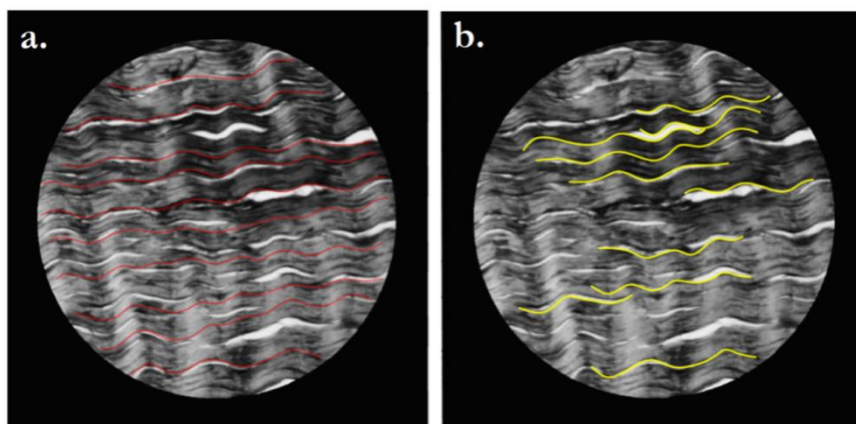
Z poměru je zřejmé, že parametr w může být v rozmezí $1 - \infty$, kdy nekonečná hodnota je spíše teoretická než praktická. Hodnota $(w-1) \times 100$ určuje, o kolik % je délka vlákna L_f větší než délka spojnice jeho koncových bodů, tedy při jaké deformaci materiálu dojde k napřímení vlákna. Z výsledných hodnot parametru w pro jednotlivá vlákna bývá zpravidla vytvořen histogram, který bývá proložen vhodnou distribuční funkcí. Podle kvartilů této distribuční funkce se dá soudit o procentuálním zastoupení různě zvlněných vláken. Výsledky z literatury jsou sumarizovány pod textem, viz Tabulka 2.

Tabulka 2. Sumarizované informace o vlnitosti kolagenních vláken

Studie	Vlnitost w[-], průměr a směr. odch.	Analyzovaná oblast
(Sokolis 2008)	králík, hrudní aorta, $1,22 \pm 0,16$ králík, krkavice, $1,24 \pm 0,16$	
(Roy et al. 2010)	králík, hrudní aorta, $1,04 \pm 0,016$	
(Rezakhaniha et al. 2012)	králík, hrudní aorta, adventicie, průměr 1,39, maximum 5	
(Davarani-Zeinali et al. 2015)	prase, proximální hrudní aorta, adventicie, $1,33 \pm 0,09$ prase, distální hrudní aorta, adventicie, $1,03 \pm 0,02$	

7.2.1 Analýza způsobů měření vlnitosti

V předchozí kapitole bylo naznačeno, že měření vlnitosti probíhá ručně. Toto měření bývá zpravidla prováděno tak, že se analyzují jen vybrané dobře viditelné segmenty kolagenního vlákna, (Sokolis 2008; Roy et al. 2010; Vesely et al. 2011). Autor této dizertační práce provedl vlastní test k analýze toho, zda se hodnoty vlnitosti budou významně lišit při výběru pouze části celkové délky vlákna nebo celé délky vlákna. K tomuto účelu byly použity histologické vzorky Achillovy šlachy, zpracované stejným způsobem jako vzorky cévní tkáně (viz kap. 5). Tento výběr byl proveden z důvodu snazší orientace v kolagenní struktuře, která je u šlachy jednosměrová. Bylo analyzováno 5 vzorků dvěma operátory. Operátor A se snažil změřit celkovou délku vlákna, operátor B změřil pouze část celkové délky vlákna. Měření bylo prováděno na každém vzorku 10× náhodně, ale vhodně k pokrytí celé oblasti, viz Obrázek 23.



Obrázek 23. Ruční měření vlnitosti u zvlněných kolagenních vláken na mikrosnímku vzorku 3 z Tabulka 3. Na mikrosnímku (a.) operátor A měřil celkovou délku vlákna, zatímco na mikrosnímku (b.) operátor B měřil pouze vybrané úseky.

K posouzení rozdílu vlnitosti byl použit parametrický 2 výběrový t-test¹⁷ test s nulovou hypotézou H_0 : *Vlnitost od obou operátorů je stejná*. Alternativní hypotéza H_a je *negací nulové hypotézy*. Výsledky vlnitostí vyhodnocených podle vztahu (13) jsou spolu s p-hodnotami sumarizovány pod textem, viz Tabulka 3.

Tabulka 3. Hodnoty změřených vlnitostí pro dva odlišné operátory. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky.

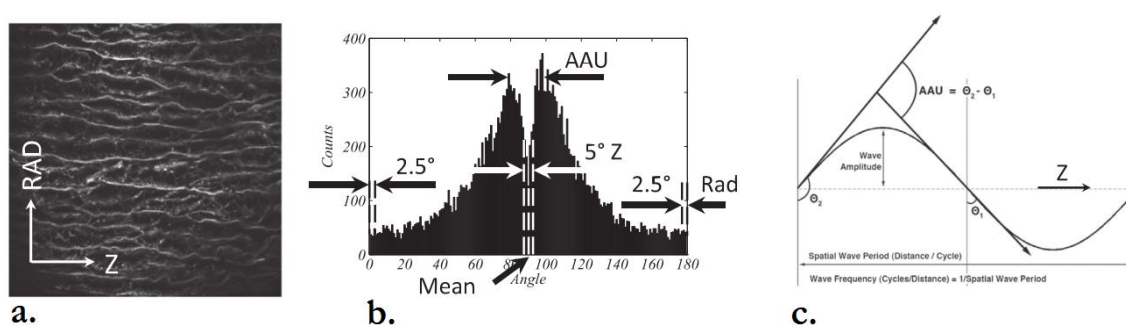
Vzorek	Vlnitost, Operátor A	Vlnitost, Operátor B	p-hodnota
1	$1,046 \pm 0,0104$	$1,089 \pm 0,0148$	0,001
2	$1,079 \pm 0,0085$	$1,082 \pm 0,0148$	0,635
3	$1,040 \pm 0,0126$	$1,067 \pm 0,0207$	0,003
4	$1,037 \pm 0,0124$	$1,057 \pm 0,0220$	0,031
5	$1,037 \pm 0,0098$	$1,064 \pm 0,0174$	0,001

¹⁷ Byla testována normalita dat podle testu Anderson-Darling a shodnost rozptylů podle Levenova testu.

Na základě výše zobrazených p-hodnot lze tvrdit, že operátoři u 4 z 5 vzorků naměřili významně odlišné hodnoty vlnitosti. Z analýzy lze taktéž vyhodnotit několik závěrů:

1. Ruční měření je časově velmi zdlouhavé.
2. Ruční měření je závislé na operátorovi. Operátor je přitahován k takovým částem vlákna / vláken, které jsou v obraze jasně viditelná. Může, a pravděpodobně také dochází, k nadhodnocení parametru vlnitosti w .

Je vhodné tedy měření zautomatizovat takovým způsobem, aby se vlnitost dala určit bez zásahu operátora a to nejlépe přímo z histogramů četností lokálních úhlů orientace zvlněného vlákna. Na takový způsob první upozornil (Tsamis et al. 2013). Ten, ačkoliv kolagenní vlákna byla zarovnána v rovině axiálně-radiální převážně axiálně, obdržel po analýze obrazu histogram s bimodální distribucí (dva vrcholy). Toto bimodální rozdělení vysvětlil následujícím způsobem. Pokud jsou kolagenní vlákna zvlněná, nejčastější zastoupení bodů bude korelovat se vzestupnou a sestupnou částí vlny. Globální orientace bude pak zastoupena minimálně, neboť globální orientaci zastupují jen vrcholy zvlněného vlákna. Grafický popis viz Obrázek 24.



Obrázek 24. Vyhodnocení parametru AAU [amplitude of angular undulation]. Na mikrosnímku (a.) jsou vidět zvlněná kolagenní vlákna v axiálně-radiální rovině. Obrázek (b.) představuje výsledný histogram s bimodální distribucí. Parametr AAU zde reprezentuje úhlovou vzdálenost mezi dvěma nejčetnějšími vrcholy. Na obrázku (c.) je pak vidět grafická interpretace tohoto parametru. Převzato z (Tsamis et al. 2013).

Zhodnocení:

Automatické vyhodnocování vlnitosti se zdá být výhodné – je rychle určitelné z histogramů a není závislé na operátorovi. Při analýze celého mikrosnímku navíc nedochází k umělému nadhodnocování vlnitosti.

Zatím nezodpovězeno však zůstává, jak parametr AAU koreluje (zda vůbec) s vlnitostí podle vztahu (13).

8 ZHODNOCENÍ KRITÉRIA MAXIMÁLNÍHO PRŮMĚRU AAA

Již v úvodu, při definici aneurysmatu abdominální aorty, bylo napsáno, že aneurysma je lokální dilatace (zvětšení) průměru artérie. Toto zvětšení postihuje přibližně 7–9 % (západní) populace starší 65 let (Lederle et al. 1997) a například v USA má za následek přibližně 10 000 úmrtí za rok (Kochanek et al. 2012; Xu et al. 2016). V ČR je procentuální postižené stejné (Belohoubek et al. 2017). Každý rok na tuto nemoc umírá ~321 mužů a ~174 žen (ČSÚ) a počet úmrtí každý rok stoupá. Důvodem může být špatný životní styl – kouření, nezdravá strava, stress (Kent et al. 2010). Zmíněná dilatace se postupně zvětšuje, až dojde k prasknutí (ruptuře) s mortalitou 79–94 % (Schlösser et al. 2010). Kolem 50 % pacientů umírá na vykrvácení v podstatě ještě dříve, než se dostane do nemocnice (Rigberg et al. 2006). Ženy mají obecně nižší prevalenci AAA, ale naopak riziko ruptury větší než muži (McPhee et al. 2007).

Aby došlo k snížení rizika náhlého prasknutí AAA, je podle aktuálních evropských směrnic (Moll et al. 2011) doporučena operace vždy, když maximální průměr (Dmax) AAA překročí 55 mm (50 mm u žen), nebo růst průměru aneurysmatu je větší než 5 mm za 6 měsíců, nebo když je aneurysma tzv. symptomatické, tedy když diagnostikovaný pacient pociťuje bolest v oblasti břicha, zad nebo boku. Limitní průměr, který byl stanoven na základě dvou velkých studií (UK Small Aneurysm Trial Participants 1998; Lederle et al. 2002), trpí neschopností rozlišit, která aneurysmata jsou skutečně riziková a která ne. Například (Darling et al. 1977) nachází během pitev, že některá AAA větší než stanovený limit nepraskla a také v našich studiích jsme měli zachycena neprasklá AAA s průměrem až 10 cm. Na druhou stranu může existovat až 17% pravděpodobnost výskytu ruptury malých aneurysmat, viz Tabulka 4.

Tabulka 4. Výčet vybraných studií zabývajících se výskytem ruptury malých AAA. Historicky seřazeno. Zkratky m = muži, ž = ženy.

Studie	Celkový počet prasklých AAA	Počet prasklých malých AAA	Procentuální výskyt malých prasklých AAA
(Nicholls et al. 1998); 10ti leté období	161 (m = 103, ž = 58)	11 ¹⁸ (m = 8, ž = 3)	6,8 %
(Skibba et al. 2015) 14ti leté období	116 (m = 84 ž = 32)	17 (m = 7, ž = 10)	14,7 %
(Kubíček et al. 2015); 3 leté období	41 (m = 32, ž = 9)	7 (m = 6, ž = 1)	17,1 %

¹⁸ V této studii jsou považována za malá aneurysmata ta, která jsou menší než 50mm; pro ostatní studie platí dříve uvedená hodnota v textu, tedy 55mm.

Výsledky o výskytu ruptury malých AAA inklinují k závěru, že by mělo být operováno jakékoliv aneurysma. Bohužel, jak bylo napsáno výše, aneurysma vzniká zpravidla u populace starší 65 let a žádný zákrok není bez rizika. Riziko je silně závislé na věku a pohlaví a pro pacienty kolem 65 let je 28denní mortalita kolem 5 %, pro lidi starší 80 let je to už 20 %; ženy mají zpravidla větší mortalitu než muži (viz [Schlösser et al. 2010](#)).

Zajímavé může být z hlediska systému zdravotního pojištění i finanční hledisko. Uvádí se, že preventivní zákrok vychází na cca 500 tisíc korun (naléhavý až 3× více).

Je tedy zřejmé, že kdyby se dokázalo lépe rozlišit, která aneurysmata jsou skutečně riziková a která ne, sníží se míra ohrožení pacienta při operaci, zachová se kvalita jeho života a dojde ke snížení finančních nákladů. Nadějným řešením je použít výpočtové modelování.

8.1 ALTERNATIVNÍ PREDIKTORY RIZIKA RUPTURY

Způsob jak vyhodnotit míru rizika ruptury jinak, než pomocí maximálního průměru, je využitím výpočtového modelování, které se provádí již po několik dekad. Metoda konečných prvků (MKP) je v současné době považována za jeden z nejsilnějších nástrojů tohoto výpočtového modelování. Velmi zjednodušený princip MKP sepsal autor této dizertační práce ve své publikaci ([Novak et al. 2017b](#)), str. 153, 1. odstavec. Jedná se zde o formulace určené spíše ne-technicky zaměřeným osobám; k hlubšímu pochopení lze doporučit kteroukoliv specializovanou literaturu přímo o MKP.

Existuje několik alternativních prediktorů rizika ruptury, které je možné pomocí MKP stanovit. Základní je výpočet již zmíněného maximálního napětí ve stěně [peak wall stress = PWS], viz studie ([Khosla et al. 2014](#)) a reference v ní. Dalším je parametr rizika ruptury [peak wall rupture risk = PWRR], který byl zaveden z důvodu, že PWS je pro řadu lidí těžko uchopitelná hodnota, která neříká nic o tom, zda stěna může či nemusí lokálně prasknout ([Gasser et al. 2010](#)). PWRR vyjadřuje převrácený součinitel bezpečnosti a je tedy definován jako poměr napětí vypočteného v daném uzlu sítě k lokální pevnosti stěny tepny. Pevnost stěny je při výpočtu měněna podle toho, zda se jedná o muže či ženu, kuřáka či nekuřáka, podle tloušťky ILT (hypoxie stěny) a podle rodinné predispozice ([Vande Geest et al. 2006b](#)).

Ještě lépe uchopitelným parametrem pro klinickou praxi je parametr ekvivalentního průměru ([Gasser et al. 2014](#)). Autoři ve studii posbírali 229 pacientů, vypočetli jejich PWRR a ortogonální průměr a z těchto hodnot udělali průměrnou odezvu PWRR vs. Dmax.

Každý pacient je pak k této průměrné odezvě vztahován a je vypočten jeho ekvivalentní průměr. Ekvivalentní průměr je tedy průměr průměrného AAA, které má stejné PWRR jako původní AAA. Průměr 55 mm a $PWRR = 0,4$ vyjadřují hraniční hodnoty rizikovosti AAA. Posledním zde uváděným a zároveň nejnovějším je pravděpodobnostní parametr (index) rizika ruptury [probabilistic rupture risk index = PRRI], který dokázal rozlišit mezi rupturovanými a intaktními aneurysmaty a má vyšší senzitivitu než samotný průměr nebo PWRR; podstata viz (Polzer et al. 2015a). Výsledný PRRI vyjadřuje roční pravděpodobnost ruptury pro vybraného pacienta. Je tedy pochopitelný pro klinickou praxi a srovnatelný s jinými kritérii vyjadřujícími riziko ruptury (pravděpodobnost úmrtí při operaci, 28 denní mortalita, atd.).

8.2 KORELACE MEZI PRŮMĚREM AAA A ALTERNATIVNÍMI PREDIKTORY RIZIKA RUPTURY

V předchozím textu se vyskytovalo několik různých parametrů jak posoudit riziko ruptury AAA. Nejvíce používaný v klinické praxi je stále parametr maximálního průměru – Dmax. Autorovi této dizertační práce se na základě rozsáhlejší literární rešerše (Ouriel et al. 1992; Lederle et al. 1995; Aarts a Schurink 1999; Wanhainen et al. 2002; Chaikof et al. 2002; Abada et al. 2003; Dillavou et al. 2003; Singh et al. 2003; Sprouse et al. 2003; Gasser et al. 2010; Dugas et al. 2012) podařilo zjistit, že měření samotného průměru je nejednoznačné. Někteří autoři měří Dmax v transverzální rovině, tj. na axiálních CT snímcích, jiní preferují měření kolmo na proudnici (ortogonální), které je po technické stránce náročnější (vyžaduje práci s 3D modelem AAA). Autor této dizertační práce se rozhodl pro různé tvary AAA (náhodně vybrané z databáze) změřit axiální i ortogonální průměr a provést korelaci mezi hodnotami obou průměrů a alternativními prediktory – PWS a PWRR.

Hypotéza byla: „*Lepší korelaci mezi Dmax a PWS, PWRR musí mít průměr, který je měřený kolmo na proudnici.*“ Platnost hypotézy lze očekávat z pohledu mechaniky ve smyslu platnosti Laplaceovy rovnice především u AAA šikmých k podélné ose těla, kdy se oba průměry významně liší.

Pro studii bylo sesbíráno 70 geometrií AAA (54 mužů s věkem 75 ± 7 let a 16 žen s věkem 73 ± 7 let).

Žádný z těchto pacientů neměl zaznamenán případ AAA v rodině, kuřáci dominovali v poměru 38:23 (9 neznámých) a chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) byla zaznamenána u 8 pacientů. Axiální (axialDmax) a ortogonální (orthoDmax) průměr byl vyhodnocen zkušenými radiology.

Jako míra šikmosti AAA byl na rozdíl od výše citovaných prací nově zaveden velmi jednoduchý parametr $D_{A-O} = \text{axialDmax} - \text{orthoDmax}$. Pro AAA rovnoběžná s osou těla je tento parametr roven nule, pro více zešikmená narůstá. Je nutné také uvést, že parametr D_{A-O} může být i pro jistá šikmá AAA velmi nízký ačkoliv křivost samotného tvaru AAA je významná, viz např. Obrázek 1, kde D_{A-O} bylo ~ 4 mm.

Konečnoprvkové analýzy byly provedeny v programu A4Clinic. Všechny výše zmíněné parametry (rodinná anamnéza, kuřák / nekuřák, CHOPN) byly v analýzách uváženy a byla jimi lokálně ovlivněna pevnost stěny, viz kapitola 8.1. Jako model materiálu stěny AAA byl zvolen model Raghavana-Vorp, viz kapitola 4.1 s materiálovými parametry viz Tabulka 1. ILT uvnitř AAA vykazuje téměř lineární odezvu, která může být dostatečně dobře popsána jedno-parametrickým model Ogdenova typu s předpisem

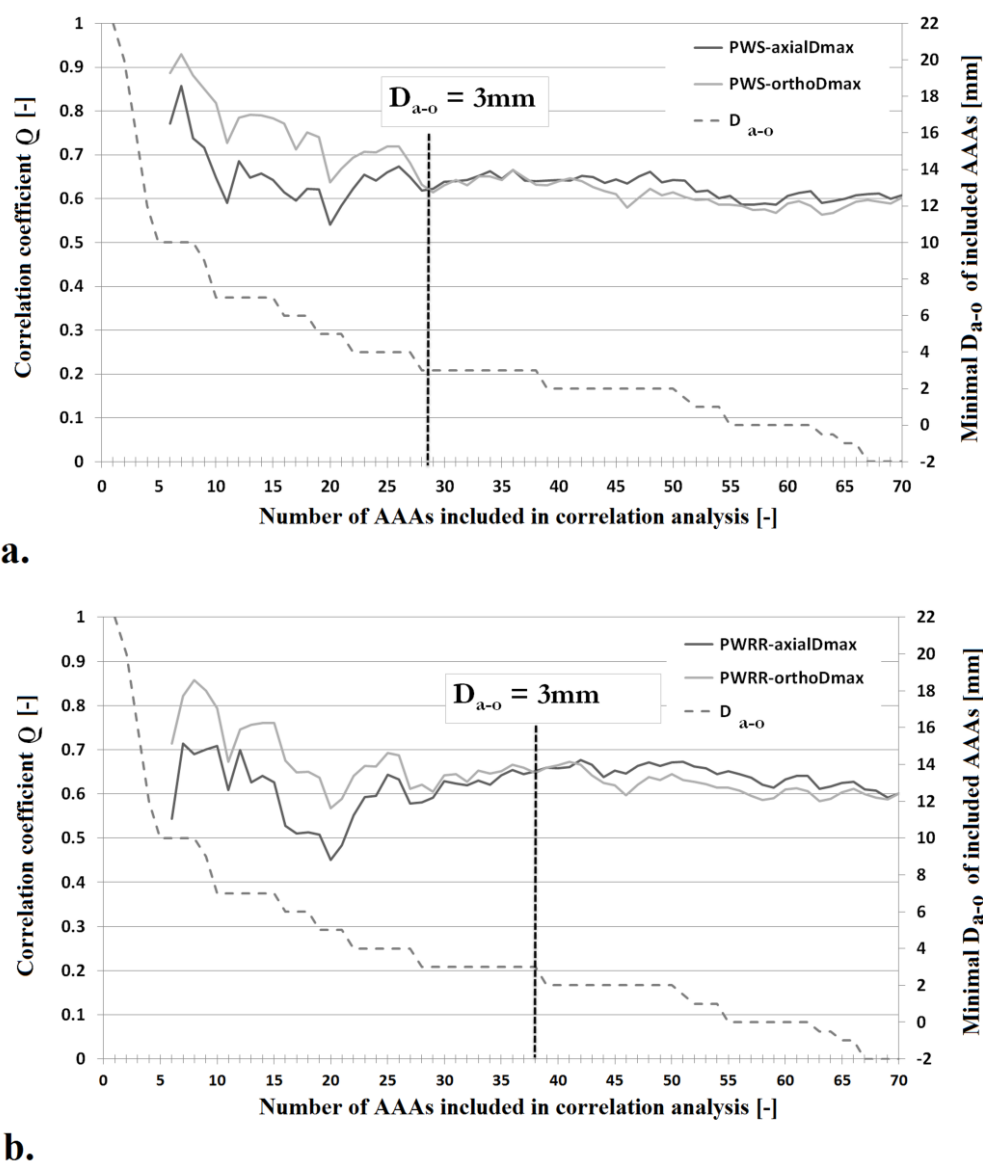
$$W = c \sum_{i=1}^3 (\lambda_i^4 - 1), \quad (14)$$

kde λ_i popisuje i-té hlavní protažení a c je napět'ový parametr. Bylo zjištěno, že ILT je tužší na lumenální straně (blíže lumen) a jeho tuhost pak pozvolna klesá směrem k abluminální straně (blíže ke stěně AAA). Podle toho byl měněn i parametr c , tj. 2,62 kPa u lumenální strany a 1,73 kPa u abluminální strany. Tyto materiálové parametry byly identifikovány pomocí in vitro testů v literatuře (Gasser et al. 2008). Mezi ILT a stěnou byl zvolen kontakt typu bonded (lineární).

Zatížení bylo realizováno pomocí středního arteriálního tlaku [mean arterial pressure = MAP], definovaného jako $1/3$ systolického + $2/3$ diastolického tlaku pro každého pacienta zvlášť. Každé geometrii byly omezeny všechny stupně volnosti v oblasti renálních tepen a těsně pod arteriální bifurkací.

Po MKP analýzách byly zaznamenány parametry PWS a PWRR (viz kapitola 8.1). Následně byly vypočteny korelace mezi jednotlivými dvojicemi PWS-axialDmax, PWS-orthoDmax a PWRR-axialDmax, PWRR-orthoDmax pomocí Spearmanova korelačního koeficientu ρ .

Pro výpočet korelací byla nejprve použita skupina šesti nejšikmějších AAA a k té byla postupně přidávána další AAA sestupně podle hodnoty D_{A-O} . Výsledek je možné vidět v grafické podobě, viz Obrázek 25.

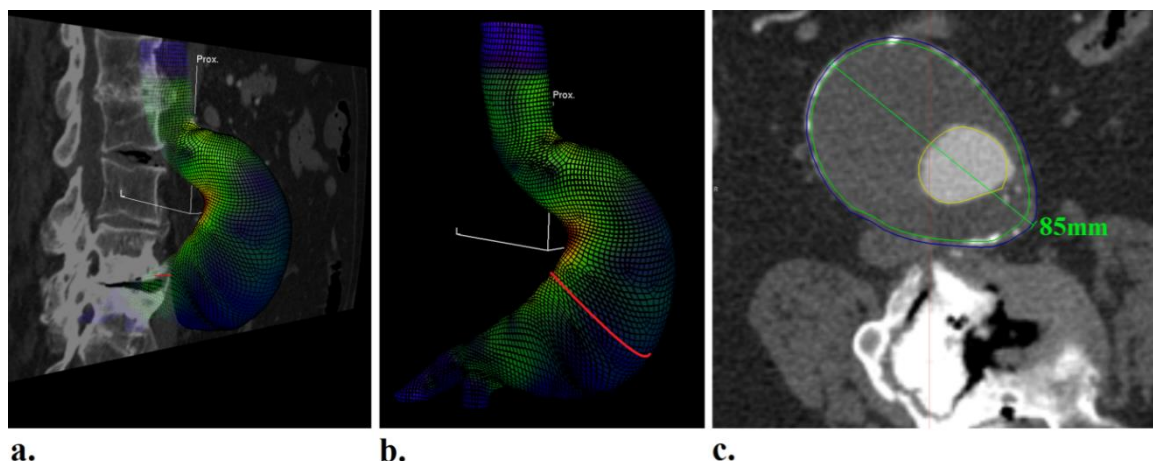


Obrázek 25. Vývoj Spearmanova korelačního koeficientu pro různé dvojice alternativních prediktorů rizika ruptury. Graf (a.) ukazuje vývoj Spearmanova korelačního koeficientu mezi PWS a axialDmax nebo orthoDmax. Graf (b.) ukazuje stejný vývoj mezi PWRR a axialDmax nebo orthoDmax. Hodnoty D_{A-O} jsou v obou grafech vykresleny čárkovanou čarou. Je vidět, že ortogonální průměr lépe koreluje s oběma alternativními prediktory – PWS a PWRR pro zešikmené tvary AAA, zatímco pro více a více rovnější AAA, postupně přidávané do analýzy, se stává rozdíl nevýznamný přibližně u $D_{A-O} < 3$ mm. Převzato z (Novak et al. 2017b).

Překlad: correlation coefficient – korelační koeficient, Number of AAAs included in correlation analysis – počet aneurysmat postupně přidávaných do korelační analýzy, Minimal D_{A-O} of included AAAs – nejmenší rozdíl D_{A-O} přidávaných AAA.

Z výše uvedeného grafu je tedy zřejmé, že pro významně zešikmená AAA (vyjádřeno parametrem D_{A-O} s hodnotou nad 3 mm) ortogonální průměr dává lepší korelaci s alternativními parametry rizika ruptury, tj. PWS a PWRR než axiální průměr.

Při postupném zahrnutí více rovných AAA se korelace stávají totožnými a dosahují hodnot $\rho \cong 0,6$. Bylo také statisticky prokázáno že axialDmax (median 58 mm, mezikvartilové rozpětí [interquartile range = IQR] 11 mm) je podstatně větší než orthoDmax (median 54,5 mm, IQR 10,8 mm) při $p < 0.0001$. Největší rozdíl mezi axialDmax a orthoDmax byl 20 mm, viz Obrázek 26.



Obrázek 26. Vybraná 3D rekonstrukce významně šikmého AAA v programu A4Clinics. Obrázek (a.) ukazuje šikmé AAA v sagitální rovině, orientace vůči páteři je zobrazena. Obrázek (b.) ukazuje červeně vyznačený ortogonální (kolmý na střednici) průměr s hodnotou 63 mm. Obrázek (c.) ukazuje axiální (v axiální rovině) průměr s hodnotou 85 mm. Rozdíl v naměřených průměrech může tedy být více než 20 mm pro vybrané AAA. Převzato z (Novak et al. 2017b).

Zhodnocení

Ve studii bylo ukázáno, že ani zdánlivě jednoduchý parametr Dmax není ve stávajících směrnících pro klinické použití definován jednoznačně. Způsob snímání při CT vede k jednoduššímu měření maximálního průměru kolmo k podélné ose těla, tak jak jsou snímány jednotlivé řezy, zatímco z mechaniky a Laplaceovy rovnice plyne, že by se měl měřit spíše ve směru hlavního (minimálního) poloměru křivosti, tedy kolmo k podélné ose AAA. Protože poměrně významné procento AAA má tuto osu sešikmenou vůči podélné ose těla, mohou se u nich výsledky měření oběma způsoby významně lišit a tím vést k odlišným klinickým závěrům.

Na základě těchto zjištění bylo možné doporučit výhradně ortogonální průměr jako jediný klinicky relevantní parametr pro posuzování rizikovitosti AAA. To je hlavní závěr článku „Correlation between transversal and orthogonal maximal diameters of AAA and alternative rupture risk predictors“. Autor této dizertační práce se na něm podílel nominálně 35 % (viz záznam VAV ID 134010 v systému Apollo) a konkrétně tento podíl spočíval v návrhu studie, MKP výpočtech, statistické analýze, podílu na přípravě rukopisu a jeho revizi.

Tento problém souvisí také s problematikou určení lokálních hlavních směrů materiálu (obvodového, axiálního) u nepravidelných tvarů AAA a tedy i s definicí směrů kolagenních vláken v jejich stěně. Přestože tedy ve stávající fázi výzkumu nebyla řešena orientace kolagenních vláken ve stěně AAA, v budoucnu k tomu jistě dojde. I když tedy tento problém zdánlivě souvisí s tématem disertační práce pouze okrajově, věnoval jsem se mu v práci podrobně, a to i pro jeho významný klinický dopad.

U výše uvedené studie se také podařilo získat relevantní soubor 70 geometrií AAA, u kterých mohla být následně provedena analýza vlivu modelu materiálu na výsledné hodnoty PWS a PWRR. Pokud by totiž platilo, že při použití řádově tužšího (de facto lineárně elastického) modelu materiálu jsou obdrženy stejné výsledky jako při použití mnohem komplikovanějších modelů, pak by logicky nedávalo smysl měkkou tkáň testovat a určovat preferenci hlavních směrů a snažit se vystavět složité strukturně – motivované modely. O testování vlivu modelu materiálu pojednává další kapitola této disertační práce.

9 Vliv modelu materiálu ve výpočtovém modelování

Otázka vlivu modelu materiálu na napjatost a tím i na predikci ruptury není stále uzavřena. V rešeršní části kapitoly 4.3 bylo upozorněno na nedostatečné vysvětlení, které převažuje ve vědeckých studiích. V rámci doktorského programu bylo toto téma také mnohokrát diskutováno, ale chybělo ověření na reálných tvarech AAA (vykazující konvexní a konkávní přechody). Až ve studii (Novak et al. 2017b) popsané v kap. 8.2 se podařilo nasbírat 70 tvarů AAA (s proměnnou tloušťkou stěny) a právě tyto geometrie byly dále analyzovány (k tvorbě konečno-prvkové sítě a výpočtu byl využit opět program A4Clinic).

Byly použity dva odlišné materiály a hodnoty PWS a PWRR pro každé AAA zaznamenány a porovnány.

Jako referenční model materiálu stěny byl zvolen model Raghavan-Vorp, viz kapitola 4.1 s materiálovými parametry viz Tabulka 1 – tedy stejný jako v předcházející studii.

Protože studie, které tvrdí, že je vliv modelu materiálu nedůležitý, používají velmi tuhé modely, byl pro srovnávací druhou simulaci zvolen tužší model, který je representován stejným hyperelastickým modelem materiálu ale se 100× vyššími konstantami C_{10} a C_{20} . To znamená nejen 100× vyšší počáteční tuhost ale i vyšší progresivitu deformačně napěťové závislosti. Počáteční tuhost (E) může být vyjádřena jako

$$C_{10} \approx \frac{\mu}{2} = \frac{E}{6}, \quad (15)$$

kde μ je počáteční modul pružnosti ve smyku, E je počáteční modul pružnosti v tahu.

V modelu Raghavan-Vorp má konstanta C_{10} hodnotu 177 kPa. Při použití vztahu (15) je pak E je ~ 1 MPa, při 100× vyšší konstantě pak E je ~ 100 MPa. Tato hodnota je $\sim 10\times$ vyšší než jaké byly naměřeny in-vivo (van 't Veer et al. 2008)¹⁹. Ačkoliv byl model materiálu stěny změněn, vše ostatní, tj. model geometrie, okrajové podmínky, model materiálu ILT, zatížení a konečno-prvková síť zůstaly vůči původní studii nezměněny. Tento fakt umožnil rychlé přepočítání všech geometrií. Maximální doba výpočtu pro jedno AAA bylo ~ 15 minut.

¹⁹ Bylo provedeno měření objemové změny AAA během srdečního cyklu se vzájemným měřením tlaku (invazivně - pomocí katetru). Byla vypočtena poddajnost AAA a z Laplaceovy rovnice odvozeno příslušné E . Nejedná se tedy o počáteční hodnoty tuhosti, ale o hodnoty při fyziologickém zatížení.

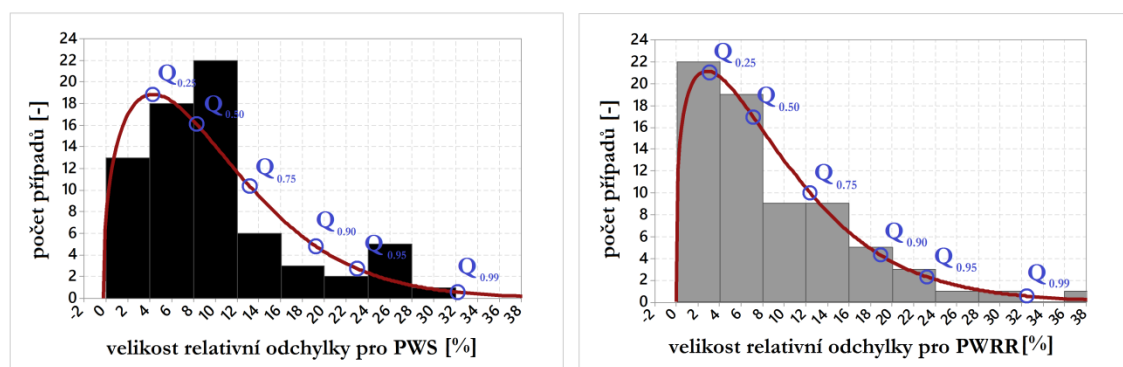
Výsledné maximální napětí a parametr rizika ruptury byly pro oba modely materiálu uloženy, viz Tabulka 5, a dále zpracovány. K posouzení statistické významnosti byl použit neparametrický znaménkový test s následující nulovou hypotézou H_0 : *oba soubory mají shodné mediány PWS a PWRR*, a s alternativní hypotézou H_a : *mediány PWS a PWRR pro tužší model materiálu jsou menší než mediány PWS a PWRR pro referenční model materiálu*.

Tabulka 5. Sumarizované výsledky maximálního napětí (PWS) a parametru rizika ruptury PWRR pro všech 70 AAA pro referenční a tužší model materiálu stěny AAA. Q_1 a Q_3 je první a třetí kvartil.

	PWS [kPa]		PWRR [-]	
	Původní model	Tužší model	Původní model	Tužší model
Průměr	226	215	0,594	0,577
Směr. odch.	59	63	0,296	0,318
Medián	210	198	0,531	0,502
Q_1	174	165	0,422	0,384
Q_3	262	243	0,681	0,663

K lepší grafické vizualizaci byly ještě vypočítány velikosti odchylek maximálního napětí a parametru rizika ruptury, seřazeny do podoby histogramů a proloženy 3 parametrickou Weibullovou (Weibull 1951) distribuční funkcí – viz Obrázek 27.

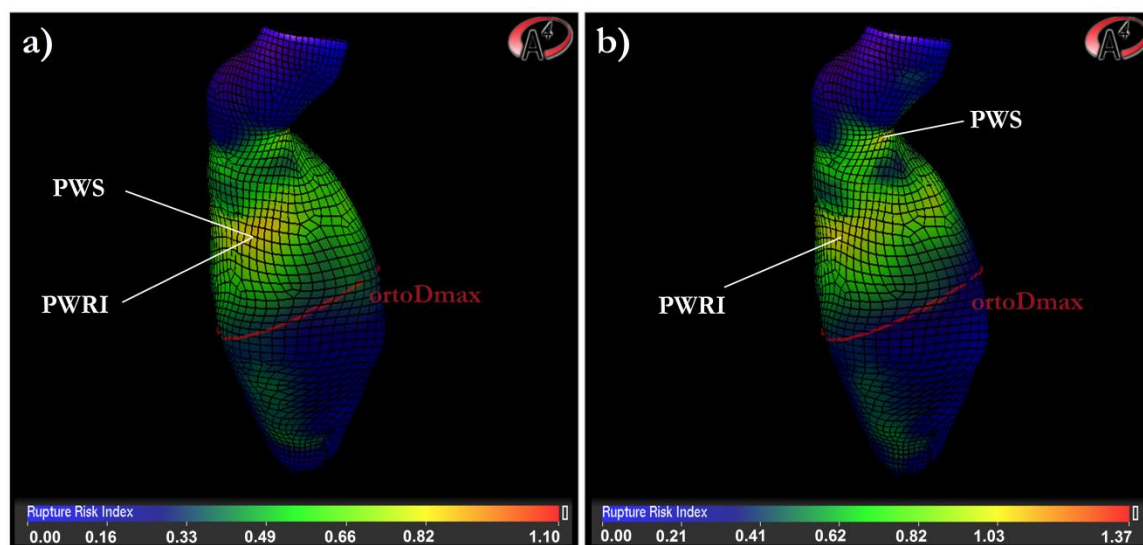
Parametry tvaru (β), měřítka (η) a hraniční hodnoty (γ) této distribuční funkce byly identifikovány na základě metody nejmenších čtverců jako $\beta=1,408$, $\eta=10,94$, $\gamma=-0,2404$ pro PWS a $\beta=1,266$, $\eta=9,796$, $\gamma=-0,07563$ pro PWRR.



Obrázek 27. Histogramy velikostí odchylek maximálního napětí (PWS) a parametru rizika ruptury (PWRR). Weibullová distribuční funkce je nakreslena červeně. Podstatné kvantily, tj. $Q_{0.25}$, $Q_{0.50}$, $Q_{0.75}$, $Q_{0.90}$, $Q_{0.95}$ a $Q_{0.99}$ byly k této distribuční funkci taktéž vypočítány a zakresleny modře.

Díky použité distribuční funkci a vypočteným kvantilům lze vyhodnotit, že v analyzované skupině 70 pacientů existuje ~10 % geometrií pacientů, kde velikost maximální odchylky, jak PWS tak PWRR, přesahuje 20 %.

Stejně tak si lze všimnout, že u 5 % geometrií je odchylka větší než 25 %. Obrázek 28 navíc ukazuje, že u některých tvarů AAA může dojít i k podstatnému přerozdělení napětí.



Obrázek 28. Konečno-prvkový model vybraného AAA. Obrázek a) znázorňuje rozložení PWRRI referenčního modelu materiálu Raghavan – Vorp. Obrázek b) znázorňuje tentýž parametr při použití tužšího modelu materiálu. Oproti původnímu modelu došlo ke zvýšení parametru rizika ruptury z hodnoty 1,10 na 1,37. Místa maximálních hodnot PWS jsou taktéž zobrazena a je možné si všimnout, že se místo maximálního napětí posunulo blíže k oblasti „krčku“ aneurysmatu. Relativní rozdíl v napětí byl pro toto AAA necelých 8 %.

Výsledky z výše uvedených statistických testů dopadly následovně. Podle znaménkového testu byla nulová hypotéza na hladině významnosti 5 % zamítnuta ve prospěch alternativní hypotézy s p-hodnotami $p=0,0003$ pro PWS a $p=0,0009$ pro PWRR. Znamená to tedy, že použití tužšího modelu materiálu vede ke statisticky významně nižším hodnotám napětí (o 11 kPa) a nižším hodnotám parametru rizika ruptury (o 0,017 [-]). Velmi podobný výsledek byl prezentován ve studii (Speelman et al. 2009). Autoři zde našli v průměru o 18 % vyšší napětí (pro 99 percentil) pro model materiálu, který odpovídal zde uvedenému referenčnímu materiálu v porovnání s materiálem s $2,6\times$ vyšší počáteční tuhostí. Na druhou stranu je nutné zdůraznit, že u celých 25 % geometrií AAA jsou velikosti odchylek zanedbatelné, tj. do 5 %. Výsledky tak nevyvracejí dosud prezentované studie, neboť při použití malého množství geometrií se vliv modelu materiálu nemusí vůbec projevit (Zelaya et al. 2014; Joldes et al. 2016).

Pokud je současným trendem určování rizika ruptury pomocí výpočtového modelování, dílčí model materiálu může být pro nezanedbatelnou skupinu pacientů významný. Obecně může vést buď k umělému podhodnocení anebo nadhodnocení (Polzer et al. 2013b) rizika ruptury, což je pro pacienta vždy nebezpečné.

V případě podhodnocení rizika by došlo k oddálení zákroku, který by však byl ve skutečnosti nutný. Naopak v případě nadhodnocení rizika je zase pacient zbytečně vystaven operaci, která je ve věkové skupině >65let spojena s významnými riziky (viz kapitola 8.), a představuje také zbytečné finanční zatížení systému zdravotní péče.

Zhodnocení

Hlavním závěrem studie „Applicability of simplified computational models in prediction of peak wall stress in abdominal aortic aneurysms“ je, že díky vyššímu počtu selhání tužšího modelu materiálu by měl být upřednostněn reálný model materiálu i přesto, že práce s ním je časově velmi náročná. Autor této dizertační práce se této studii podílel nominálně 50% (viz záznam VAV ID 143315 v systému Apollo) a konkrétně tento podíl spočíval v návrhu studie, MKP výpočtech, statistické analýze, podílu na přípravě rukopisu a jeho revizi.

Druhou a neméně významnou otázkou je, zda ve výpočtovém modelování používat izotropní nebo anizotropní modely materiálu. Ačkoliv žádná studie určující prioritu izotropie či anizotropie neexistuje, je dobře známo, že stěna AA a AAA vykazuje jistou míru anizotropie a výsledky PWS mohou být anizotropií ovlivněny (Vorp 2007; Rodríguez et al. 2008). Samotná anizotropie je dána především uspořádáním kolagenních vláken (viz kapitola 3.1), které určují typický zpevňující charakter při vyšším zatížení. Modely, které by tuto závislost mohly postihnout jsou velmi komplikované – viz kapitola 4.2.2. Téměř vždy chybí dokonce jejich validace, posouzení robustnosti a predikčních schopností.

Díky tomu se autor této doktorské práce zapojil do studie navrhnuté jeho školitelem specialistou – Stanislavem Polzerem, Ph.D. s cílem získat informace o struktuře tkáně, tedy především o uspořádání kolagenních vláken, a získané strukturní parametry zahrnout do strukturně motivovaného konstitutivního modelu, tento model validovat a posoudit jeho predikční schopnosti (viz kapitola 4.2).

Závěr dizertační práce bude věnován návrhům zcela nových automatických algoritmů k určení směrové orientace a určení vlnitosti kolagenu (viz kapitoly 11 a 12).

10 VALIDACE STRUKTURNĚ MOTIVOVANÉHO KONST. MODELU

Tato část bude primárně zaměřena na snahu validovat uvedený konstitutivní model (Martufi a Gasser 2011), respektive posoudit jeho schopnost predikovat biaxiální odezvu prasečí tkáně s předem definovanými strukturními parametry, které byly získány pomocí analýzy pořízených histologických mikrosnímků.

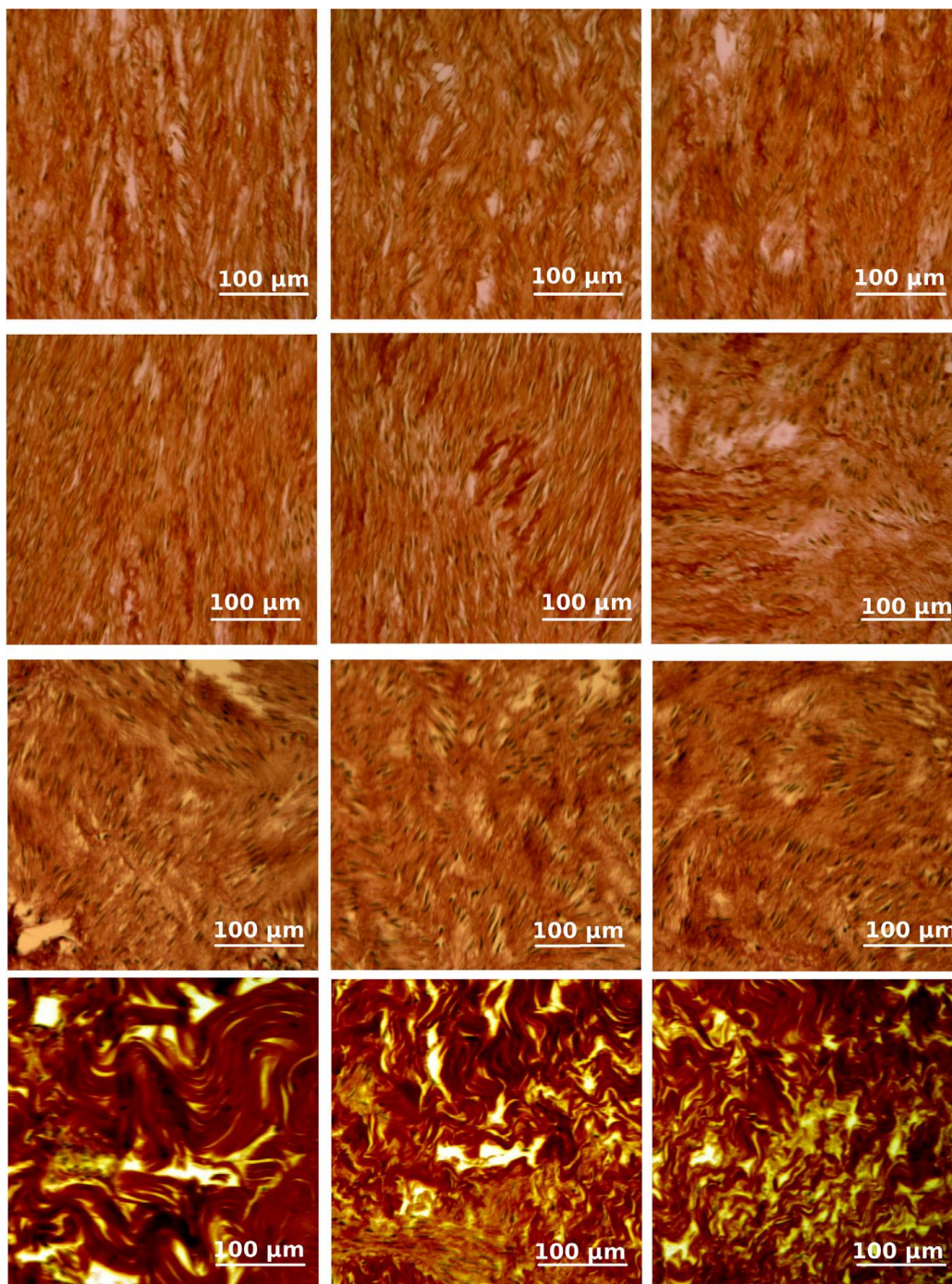
10.1 DETEKCE SMĚRŮ KOLAGENNÍCH VLÁKEN POMOCÍ ALGORITMU ZALOŽENÉHO NA FFT

V kapitole 7.1.2 bylo zmíněno několik algoritmů na detekci hlavních směrů ze struktury měkké tkáně. Zároveň bylo poukázáno na limity těchto algoritmů, které překonal algoritmus FFT, který byl v posledních letech významně vylepšen (Polzer et al. 2013a). Výsledky, které byly pomocí tohoto algoritmu obdrženy, budou popsány nyní.

Z jatek Steinhauser bylo získáno 9 prasečích hrudních aort a z každé byl vyseknut jeden vzorek, celkově tedy 9 vzorků. Způsobem detailně popsaným v kapitole 5 byly vzorky dále fixovány a předány k histologickému zpracování. Předmětem zájmu byla dominantně obvodově-axiální rovina a tak byly vzorky nařezány na Mikrotomu na řezy o tloušťce 5 μm s roztečí přibližně 120 μm . V závislosti na tloušťce vzorku bylo obdrženo 12–14 řezů. Řezy byly obarveny PSR ke zvýraznění kolagenních vláken a zároveň Weigertovým hematoxylinem k zvýraznění jader hladkých svalových buněk. Vytvořené řezy byly nasnímány za bílého světla. U každého histologického řezu bylo pořízeno 80–250 mikrosnímků (rozlišení 100 \times , velikost obrázku 2592 \times 1944 px). Počet nasnímaných mikrosnímků z jednotlivých řezů se významně lišil, protože bylo nutné vyloučit překryté oblasti, větší díry, okraje, atp., které by způsobovaly artefakty v obraze a mohly způsobit chybnou interpretaci výsledků, viz (Polzer et al. 2013a). Celkově bylo pořízeno ~9000 snímků, které byly následně analyzovány.

Protože vzhled kolagenních vláken ve vrstvě medie a adventicie vypadá odlišně, byl algoritmus FFT kalibrován (viz postup popsaný v kapitole 7.1.2) pro každou vrstvu zvlášť. Na základě kalibrace byl pro vrstvu medie stanoven parametr $w=6,0$ s $r=0,87$ a $R^2=0,75$ a pro vrstvu adventicie $w=2,0$ s $r=0,31$ a $R^2=0,11$. Nízká hodnota r a R^2 pro adventicii je dána téměř izotropní orientací kolagenních vláken, takže nalezení dominantního směru vláken je z principu špatně podmíněné, ale tento fakt nemá významný dopad na výsledky.

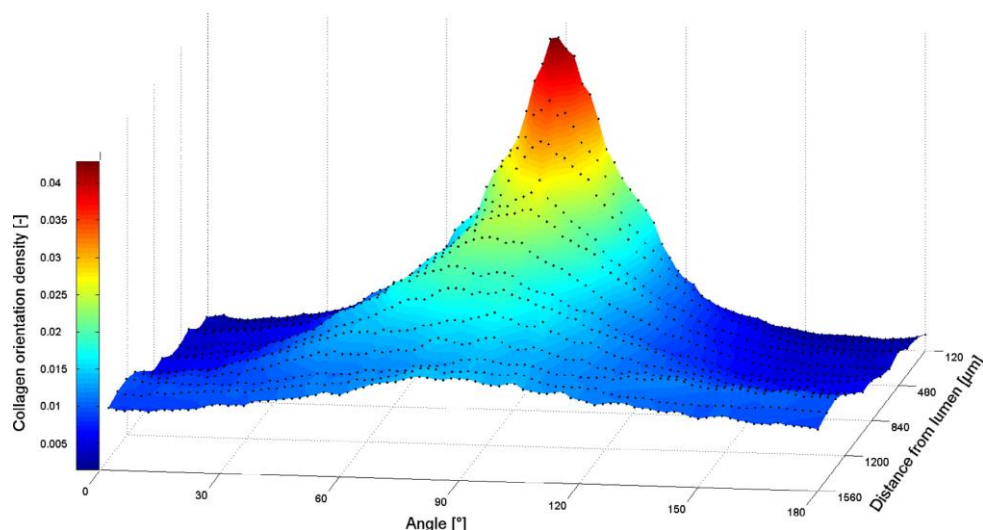
Celkový vzhled prasečí cévy od vnitřní strany medie k adventicii ukazuje Obrázek 29 a popis výsledků je v následujícím textu.



Obrázek 29. Mikrosnímky barvené PSR. Mikrosnímky jsou seřazeny od medie (všechny 3 obrázky v horní řadě) po adventicii (všechny 3 obrázky ve spodní řadě). První řada je přibližně 120 μm od lumenu, druhá řada 480 μm a třetí 1080 μm . Obvodový směr je dán vertikální osou snímků. Zvětšení 100 \times . Převzato z ([Polzer et al. 2015b](#))

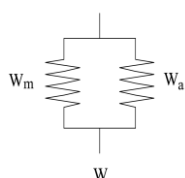
Alespoň kvalitativně lze z výše uvedeného obrázku tvrdit, že buňky hladkého svalstva jsou orientovány shodně se směrem kolagenních vláken a jsou mírně protaženy, což je v souladu s prací ([O'Connell et al. 2008](#)). Zajímavý je také fakt, že buněk hladkého svalstva přibývá spojitě se vzdáleností od lumenu (nebylo kvantifikováno).

Analýza mikrosnímků (např. viz Obrázek 29) pomocí FFT globálně ukazuje následující závěr. V medii jsou vlákna orientována dominantně v obvodovém směru, tj. existuje zde značná anizotropie. Tato anizotropie se postupně snižuje se vzdáleností řezu od lumenu. Ve vrstvě adventicie (10.–12. vrstva ~1320–1560 μm od lumenu) tak již nelze rozhodnout o preferovaném směru, jedná se spíše o izotropní rozložení vláken.



Obrázek 30. Distribuce orientací kolagenních vláken v hrudní části prasečí cévy zprůměrovaná pro všech 9 vzorků. Obvodový směr odpovídá úhlu 90°. Publikováno v (Polzer et al. 2015b).

Protože se distribuce směrů kolagenních vláken podstatně liší v obou vrstvách, byla stěna tepny popsána různými modely pro adventicii a medii. Vznikl tedy dvouvrstvý konstitutivní model (s paralelním zapojením obou částí) s předpisem



$$W = W_m + W_a, \quad (16)$$

kde W_m odpovídá energii napjatosti média, a W_a odpovídá energii napjatosti adventicie. Obě energie napjatosti jsou řízeny vztahem (10). Celkově tedy musí být identifikováno 12 parametrů. Šest parametrů je tuhostních (2× tuhost matrice, 4× tuhost vláken, a šest parametru strukturních)

Strukturní parametry, tj. směrová orientace a disperze, byly identifikovány ve smyslu minimalizování kvadrátů čtverců mezi výsledným histogramem a von Misesovou distribuční funkcí danou rovnicemi (7.1) a (7.2). Parametry určující počáteční (λ_{\min}) a koncové (λ_{\max}) zapojení kolagenních vláken byly odhadnuty na základě literatury (Sokolis 2008; Lillie et al. 2010; Roy et al. 2010; Tsamis et al. 2013). Hodnoty těchto parametrů jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 6. Strukturní parametry pro dvouvrstvý konstitutivní model

Definice strukturního parametru kolagenních vláken	Medie	Adventicie
Střední orientace	$\mu_m = 90^\circ$	$\mu_a = 90^\circ$
Parametr koncentrace	$b_m = 1,03$	$b_a = 0,27$
Dolní limit pro napřímení vláken	$\lambda_{m_min} = 1,0$	$\lambda_{a_min} = 1,25$
Horní limit pro napřímení vláken	$\lambda_{m_max} = 1,1$	$\lambda_{a_max} = 2,0$

Z rovnice (16) tak bylo specifikováno 8 z 12 parametrů. Zbylé čtyři tuhostní parametry již nemohou být obecně získány z literatury, neboť vždy závisí na (hmotnostním) poměru jednotlivých proteinů v jednotlivých vrstvách. Tuhostní parametr matrice (elastinu) v adventicii c_a byl nastaven na nulovou hodnotu, tedy $c_a = 0$ kPa, protože příspěvek elastinu je u ní zanedbatelný a vlákna jsou silně zvlněná (viz Obrázek 29 dolní řada). Zbylé tři parametry, tedy c_m , k_m , a k_a byly získány na základě mechanických zkoušek.

10.2 MECHANICKÉ TESTOVÁNÍ TKÁNĚ

Všechny mechanické zkoušky byly prováděny na biaxiálním trhacím stroji vyrobeném v r. 2004 dle vlastního návrhu firmou Camea s.r.o.. Tento stroj umožňuje provádět dvouosé a jednoosé zkoušky s řízenými posuvy nebo silami. K uchycení vzorků je použito několik úzkých svorek (Bursa a Zemanek 2008). Systém uchycení vzorku přes tyto svorky zaručuje homogenní pole napjatosti a deformace uprostřed vzorku, dosáhnutí vyšších hodnot napětí a umožňuje také velmi snadnou a rychlou výměnu vzorku během testování (Polzer et al. 2013b; Slazansky et al. 2016).

Před samotným testováním je nutné vzorky tzv. předcyklovat. Ekvibiaxiální předcyklování probíhalo za rychlosti 0,333 mm/s při maximálním posuvu 6,3 mm, což odpovídalo přetvoření ~35 %. Předcyklování bylo ukončeno, když maximální rozdíl sil vůči předchozímu cyklu byl menší než 0,02 N; to odpovídalo většinou 5–10 cyklům. Síly byly měřeny 20N tenzometrickou jednotkou s přesností třídy C3. Protože toto předcyklování tkáně mohlo díky plasticitě změnit její rozměry, byl po něm vzorek vyjmut ze zkušebního stroje a podrobně změřen, tj. byla změřena jeho tloušťka T , axiální L_a a obvodové L_o rozměry. Po tomto kroku byl vzorek znovu uchycen do svorek a bylo započato samotné testování.

Ostré testování bylo provedeno pro dvě skupiny vzorků. **První skupina** (tzv. konstrukční) sloužila pro stanovení tuhostních parametrů. **Druhá skupina** měla sloužit pro validaci modelu. V případě první skupiny bylo měření provedeno na devíti vzorcích v pěti různých zatěžovacích protokolech, tj. deformačních režimech s poměry posuvů v axiálním a tangenciálním směru 1:1, 1:2, 1:5 a 5:1, 2:1. Všechna data z testování jsou uložena on-line v článku (Polzer et al. 2015b) a v této práci nebudou již uváděna.

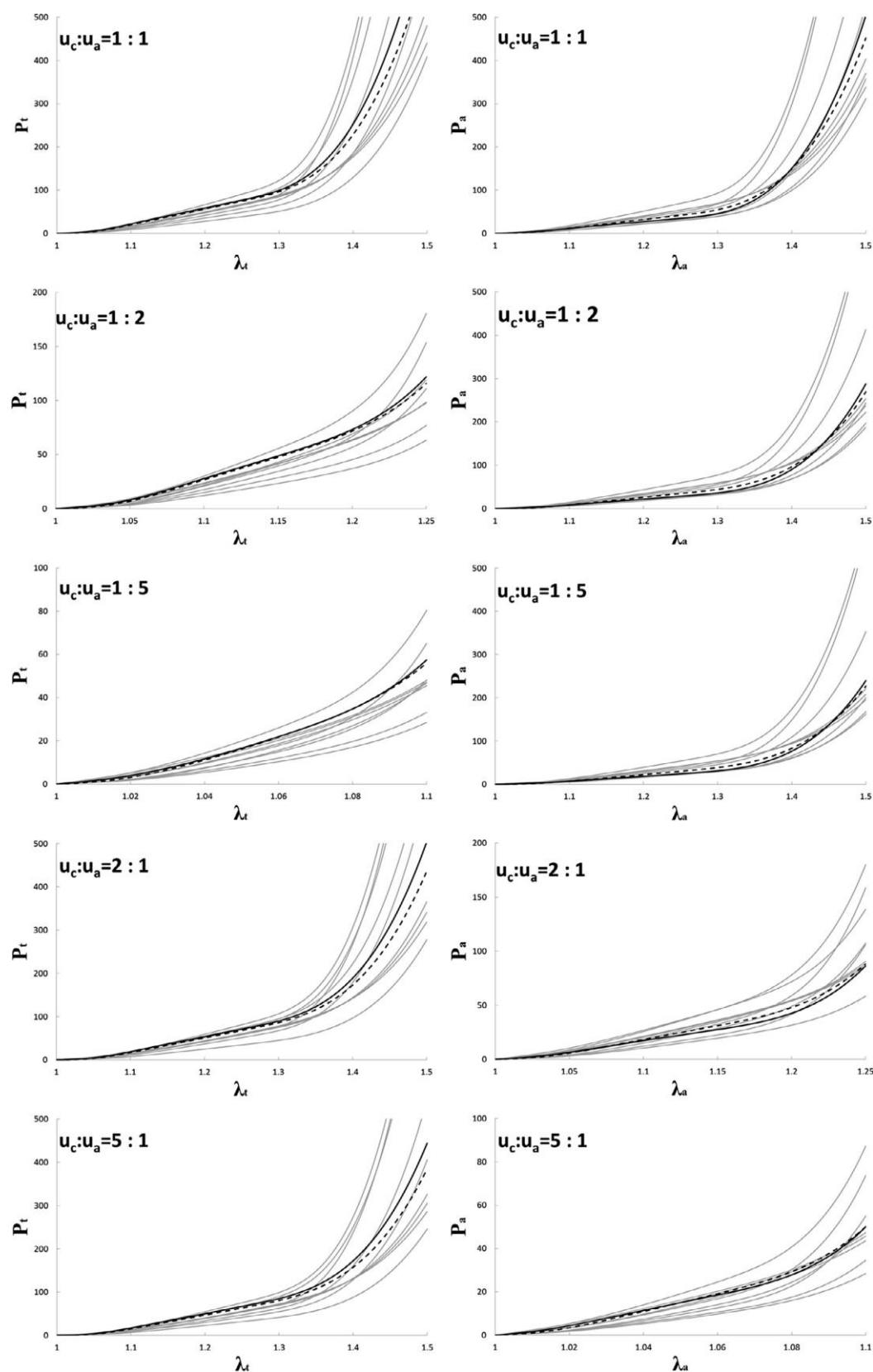
Parametry (c_m , k_m , k_a) zohledňující střední odezvu tkáně byly identifikovány ze všech vzorků ($n=9$) a všech protokolů ($n=5$) najednou, což je mnohem věrohodnější než průměrování naměřených parametrů pro jednotlivé vzorky nebo průměrování naměřených křivek, které vnáší do identifikace parametrů další nejistotu. Kvalita zachycení experimentální odezvy modelem byla kvantifikována koeficientem determinace ($R^2 > 0,92$) a střední relativní odchylkou ($\Delta\bar{p} < 30\%$). Výsledné parametry jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7. Mechanické parametry modelu reflektující střední odezvu prasečí aortální tkáně

Definice parametru	Médie	Adventicie
Tuhost matrice (elastin)	$c_m = 11,0 \text{ kPa}$	$c_a = 0 \text{ kPa}$
Tuhost kolagenu	$k_m = 230 \text{ kPa}$	$k_a = 27 \text{ MPa}$

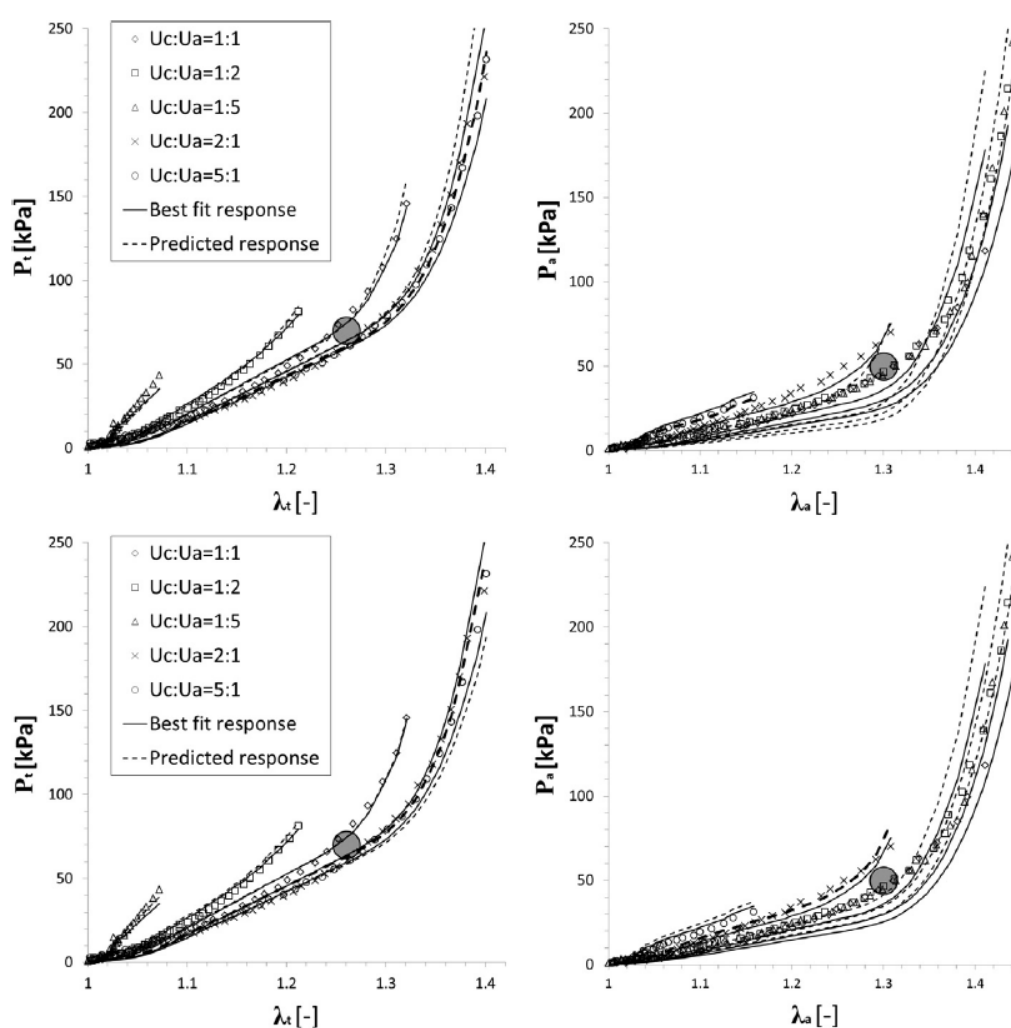
10.3 VALIDACE A PREDIKČNÍ SCHOPNOSTI MODELU

Druhá skupina sloužila pro validaci modelu. Byla složena z odlišných 9 vzorků a opět bylo provedeno 5 testovacích režimů pro každý vzorek. Pro tuto skupinu bylo, na rozdíl od první skupiny, identifikováno 5 parametrů, tj. nejen (c_m , k_m , k_a), ale i (b_m , b_a). Výsledné odezvy všech 9 vzorků pro všechny režimy jsou vykresleny níže. Protože obě černé čáry pro obě skupiny vzorků a oba způsoby identifikace parametrů modelu leží vždy zhruba uprostřed šedých čar (viz Obrázek 31), můžeme tvrdit, že model je tímto validován.



Obrázek 31. Je zobrazena biaxiální odezva modelu pro individuální vzorky (šedé čáry) z druhé, validační skupiny. Černou plnou čarou je dokreslena střední odezva tkáně s materiálovými parametry uvedenými v tabulce 8. Černou čárkovou čarou je vykreslena stejná střední odezva, jen s tím rozdílem, že strukturální parametry b_m a b_a byly ponechány volné. Převzato z (Polzer et al. 2015b).

Predikční schopnosti modelu byly testovány následujícím způsobem. Pro každý testovaný vzorek byl pro identifikaci parametrů modelu použit jen jeden neekvibiaxiální protokol, tj. 5:1 nebo 2:1. Byly použity strukturní parametry z tabulky 7 a zbylé parametry (tj. c_m, k_m, k_a) byly dopočteny na základě této jediné odezvy. Model s těmito parametry byl pak použit k predikci zbývajících čtyř deformačních protokolů téhož vzorku. Míra kvality predikce byla opět kvantifikována pro oba protokoly zvlášť, přičemž lépe dopadl protokol 2:1 (median $R^2=0,92$, standard. odch. 0,04) než protokol 5:1 ($R^2=0,89$, standard. odch. 0,87). U protokolu 5:1 dva vzorky z osmnácti zcela selhaly ($R^2 < -1$). Ukázku schopnosti zachytit trend experimentů a predikční schopnosti pro jeden ze vzorků ukazuje obrázek 32.



Obrázek 32. Biaxiální odezvy vzorku č. 12. Symboly značí experimentální data ze všech 5 protokolů. Černá plná čára reprezentuje odezvu modelu. Čárkovaná čára naopak určuje predikční odezvu modelu, data k ní byla získána jen z protokolu 5:1 (horní řada) nebo 2:1 (spodní řada). Větší šedé kolečko určuje předpokládaný fyziologický stav. Převzato z (Polzer et al. 2015b)

Pro kompletnost je vhodné doplnit informace o získané hodnotě fyziologického stavu a informaci o tom, jak se jednotlivé vrstvy podílejí na přenosu zatížení.

Hodnoty fyziologického stavu byly získány na základě předpokladu o

- a) velikostí axiálního předpětí ve zdravé cévě, což odpovídá $\sim 30\%$; k tomu je pak možné dopočítat hodnoty (prvního Piola-Kirchhoffova) napětí $P_a = \sim 50$ kPa. Tato hodnota se konkrétně váže ke 12. vzorku, viz Obrázek 32. Konstitutivní model byl Martufi-Gasser (viz rovnice (10) s kombinací paralelního spojení vrstev podle předpisu (16)). Materiálové parametry pro tento 12. vzorek byly $c_M=8$ kPa, $k_M=200$ kPa, $b_M=1$, $k_A=46$ MPa, $b_A=0,25$.
- b) platnosti Laplaceovy rovnice ve tvaru $P_t = \frac{p(D/2)}{T}$ s předpokládanými vstupy $p=13$ kPa (střední arteriální tlak), $D=25$ mm a $T=2,31$ mm (změřena; medián obou skupin). Vypočtené 1. Piola-Kirchhoffovo napětí pak odpovídá ~ 70 kPa, což odpovídá přibližně smluvnímu obvodovému přetvoření 26 %. Tato hodnota se opět váže jen ke 12. vzorku, opět viz Obrázek 32.

Z porovnání strukturních parametrů, především pak $\lambda_{a\max}$ je zjevné, že se vlákna v adventicii začínají zapojovat při protažení $\sim 25\%$. Pro vzorek č. 12 se tak dá ukázat, že medie nese téměř 99% obvodového a téměř 90% axiálního napětí. To dobře potvrzuje hypotézu o tom, že medie nese převážnou část zatížení a adventicie je vrstva, která se zapojuje při přetížení.

Dalším podstatným zjištěním je, že podle zjištěných tuhostních parametrů a vizualizace odezvy je zřejmé, že se kolagenní vlákna v medii zapojují již při nízkých deformacích. Tento fakt podporují i poměrně napřímená vlákna v histologických mikrosnímcích, viz Obrázek 29. V odborné literatuře se přitom většinou předpokládá, že odezva tkáně je při nízkých deformacích řízena dominantně tuhostí elastinu (Holzapfel et al. 2000).

Výše uvedené jsou nejpodstatnější závěry ze studie „Structure-based constitutive model can accurately predicts planar biaxial properties of aortic wall tissue“. Autor této dizertační práce se této studii podílel nominálně 10% (viz záznam VAV ID 113126 v systému Apollo) a konkrétně tento podíl spočíval v experimentálním měření, zpracování obrazu a revizi manuskriptu

10.4 DISKUSE A MOŽNÉ OMEZENÍ STUDIE

Je důležité upozornit, že byla naplněna specifika pro „dobře-podložený“ strukturní konstitutivní model jak bylo naznačeno již v kapitole 4.2. Podstatná část parametrů byla identifikována ze struktury tkáně pomocí ověřeného algoritmu, který extrahoval data z celkově ~9000 obrázků, což je nejvíce obrazového materiálu, který kdy byl k popisu struktury pořízen a analyzován. Výsledky se považují za věrohodné, ačkoliv v porovnání se světovou literaturou mohou být odlišné. Bylo identifikováno, že se ve stěně prasečí aorty po celé její tloušťce vyskytuje jen jedna rodina kolagenních vláken se zarovnáním v obvodovém směru. Ve vrstvě medie jsou tyto výsledky v souladu se studiemi (Finlay et al. 1995; O'Connell et al. 2008; Schriebl et al. 2012b; Sáez et al. 2016). Ve vrstvě adventicie jsou však výsledky značně rozdílné. Byly nalezeny vlákna v axiálním směru (Finlay et al. 1995) pro mozkové artérie (blíže nespecifikováno), diagonálně (Holzapfel et al. 2000; Schriebl et al. 2012b, 2012c) pro lidskou hrudní i abdominální aortu, ale i kombinace obvodového, axiálního a diagonálního směru (Wicker et al. 2008) pro mozkové (bazilární) artérie.

Autor této dizertační práce se domnívá, že odlišné závěry v těchto pracích mohou být způsobeny několika fakty:

1. Jedná se převážně o rozdílné typy tepen (aorta vs. bazilární artérie a jiné mozkové tepny) pocházející z různých savců (člověk vs. prase vs. králík).
2. Měření ve světové literatuře bylo provedeno manuálně, kde operátor může preferovat některé směry a jiné ignorovat. Zpravidla ani množství analyzovaných snímků není vysoké (viz. kapitola 7.2.1). Může tak vzniknout preference dvou směrů – dvou rodin kolagenních vláken. Jistá informace o dvou rodinách kolagenních vláken byla mimochodem okem viditelná i na našich snímcích – viz Obrázek 29 druhý snímek vlevo od spodu, kde se dají okem pozorovat dva preferenční směry. Pokud se tedy vyhodnotí jen několik podobných snímků, výsledkem jsou dvě rodiny vláken, i když v kontextu všech 9000 snímků to znamená jen zvýšený rozptyl směrů.
3. Měření ve světové literatuře bylo provedeno automatickým NEkalibrovaným algoritmem. Z výsledků takových algoritmů se nedá kvantifikovat míra preference směrů, která může být zatížena výraznou disperzí, která prakticky preferenční směr ruší. Pokud jsou vlákna navíc výrazně zvlněná, algoritmus může detekovat vzestupnou a sestupnou část zvlněného vlákna, což operátor interpretuje jako globální směr vlákna.

Ze studie si lze všimnout, že i kalibrovaný algoritmus FFT

- a) nevyhodnocuje směry jen kolagenních vláken, ale i jisté části pozadí
- b) neumožňuje kvantifikovat procento kolagenních vláken v obraze.

Možností, která by posuzovala jen kolagen, je polarizovaná mikroskopie. Její princip je prostý (viz konec kapitoly 6) a jde jen o to, najít způsob jak zautomatizovat proces otáčení rotačním stolem. Při správné automatizaci by se tedy mělo jednat o metodu specifickou pro kolagen, která nebude analyzovat šum a umožní kvantifikaci procento kolagenních vláken v obraze.

Metoda polarizované mikroskopie by se tak stala rychlou a přesnou (výsledky by nebyly závislé na operátorovi, viz kapitola 7.1.2).

V další části se tak práce zaměřuje na vývoj nového automatického algoritmu, který by vyhodnocoval informace o struktuře cévy z mikrosnímků polarizované mikroskopie.

11 DETEKCE SMĚRŮ KOLAGENNÍCH VLÁKEN POMOCÍ ALGORITMU ZALOŽENÉHO NA FÁZOVÉ KORELACI

Princip polarizační metody byl uveden již na konci kapitoly 6. Připomeňme základní vlastnosti:

- a) intenzita se mění s periodou 90° (při vzájemně kolmo zkřížených filtrech).
- b) vlákna jsou tmavá při 0° , 90° , 180° , 270° a znovu při 360° .
- c) vlákna jsou naopak nejsvětlejší při 45° , 135° , 225° a 315° .

Při zautomatizování jde tedy o to, sledovat intenzitu v jednotlivých bodech vzájemně otočených mikrosnímků (vhodný výsek – 2×2 px, 5×5 px, maximálně však 10×10 px). Za tímto účelem je však nutné tyto vzájemně otočené mikrosnímky otočit a posunout zase zpět na pozici toho prvního. Pak budou pixely všech mikrosnímků vzájemně jednoznačně přiřazeny a jejich intenzity půjde porovnat a následně i predikovat úhel vyhasnutí. K tomuto účelu se dá využít Fázová korelace obrazu.

11.1 FÁZOVÁ KORELACE OBRAZU

Je důležité zmínit, že matematická podstata této metody zde nebude diskutována a čtenáři jsou odkázáni např. na práci ([Druckmullerova 2010](#)). Podstatou této metody je nalezení rotace a translace (a změny měřítka, kterou zde nevyužíváme, protože naše mikrosnímky mají stejné zvětšení) mezi obrazy. Fázová korelace má předpis:

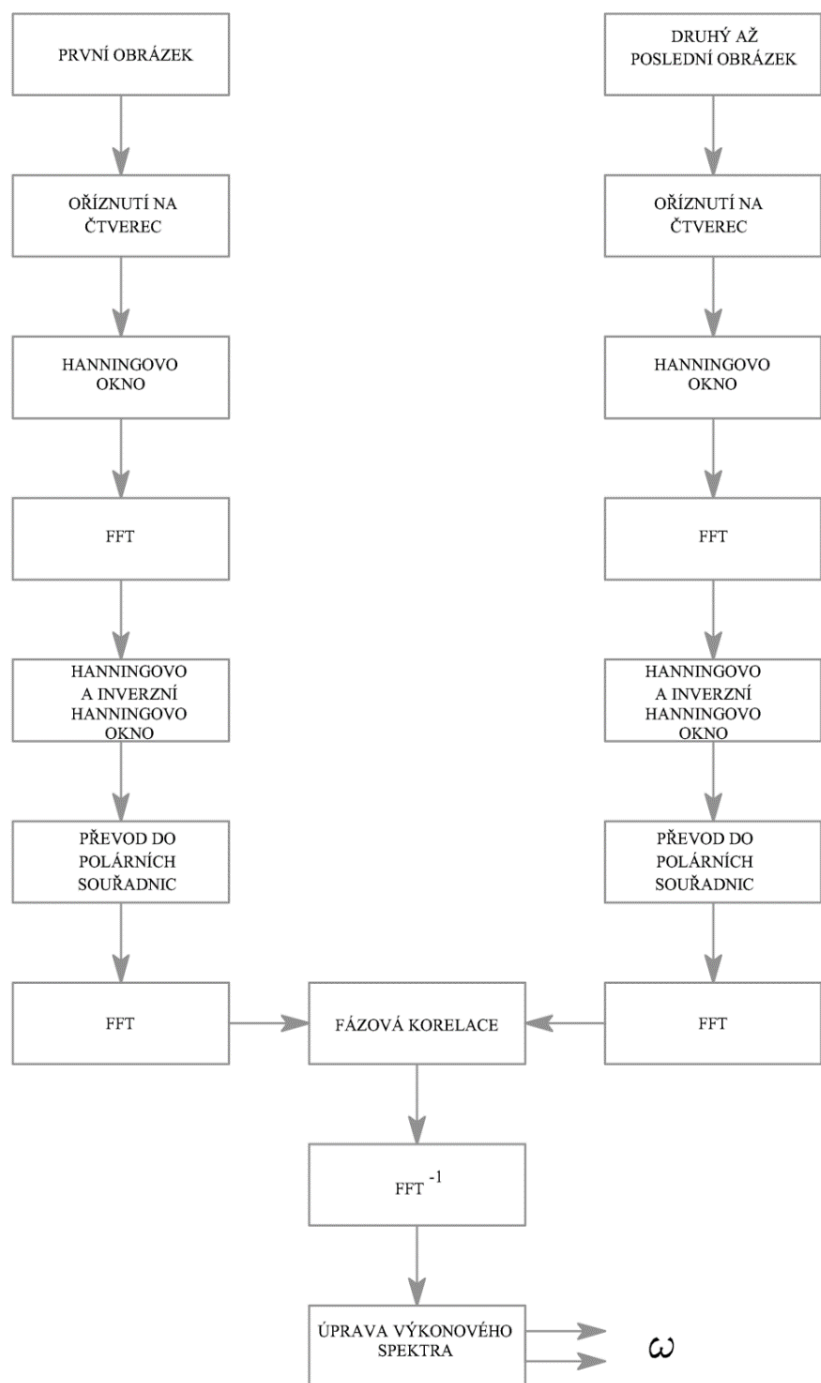
$$D(x, y) = \frac{\mathcal{F}_1 \cdot \mathcal{F}_2^*}{|\mathcal{F}_1| \cdot |\mathcal{F}_2^*|} \quad (17)$$

kde \mathcal{F}_1 a \mathcal{F}_2 jsou FFT (vysvětleno viz kapitola 7.1.2) transformace prvního a druhého obrazu, \mathcal{F}_2^* je komplexně konjugovaná k \mathcal{F}_2 . Součin $\mathcal{F}_1 \cdot \mathcal{F}_2^*$ je někdy označován jako křížové výkonové spektrum (podle typického kříže ve frekvenční oblasti) a součin $|\mathcal{F}_1| \cdot |\mathcal{F}_2^*|$ je chápán jako normalizační faktor. Pro určení rotace a translace je nutné provést inverzní FFT výrazu (17), tedy

$$V = \mathcal{F}^{-1}[D(x, y)]. \quad (18)$$

Pro vysvětlení základního principu fázové korelace byl zvolen snímek Achillovy šlachy. Při analýze se začíná pořízením mikrosnímku ve formátu .bmp nebo .tiff. Tyto formáty obrazových souborů jsou bez komprese a je mezi nimi zanedbatelný rozdíl. V rámci práce byl použit soubor s příponou .bmp (software ke kameře neumožňoval uložení jiného formátu).

Každý takový mikrosnímek má zpravidla větší šířku než výšku, např. 1280×960 px. Mikrosnímky bývají převedeny do stupně šedi (na určení orientace není potřebné znát intensity všech barev, tj. červené, modré a zelené) a následně do formátu double (převádí intensity pixelů na rozsah 0–1, což bylo u originálního algoritmu dostatečné). Následně jsou všechny mikrosnímky oříznuty nebo zvětšeny na čtverec (zvětšení viz (Polzer et al. 2013a), tj. např. na hodnotu 960×960 px nebo 1280×1280 px a je pokračováno podle názorného schématu, viz Obrázek 33.



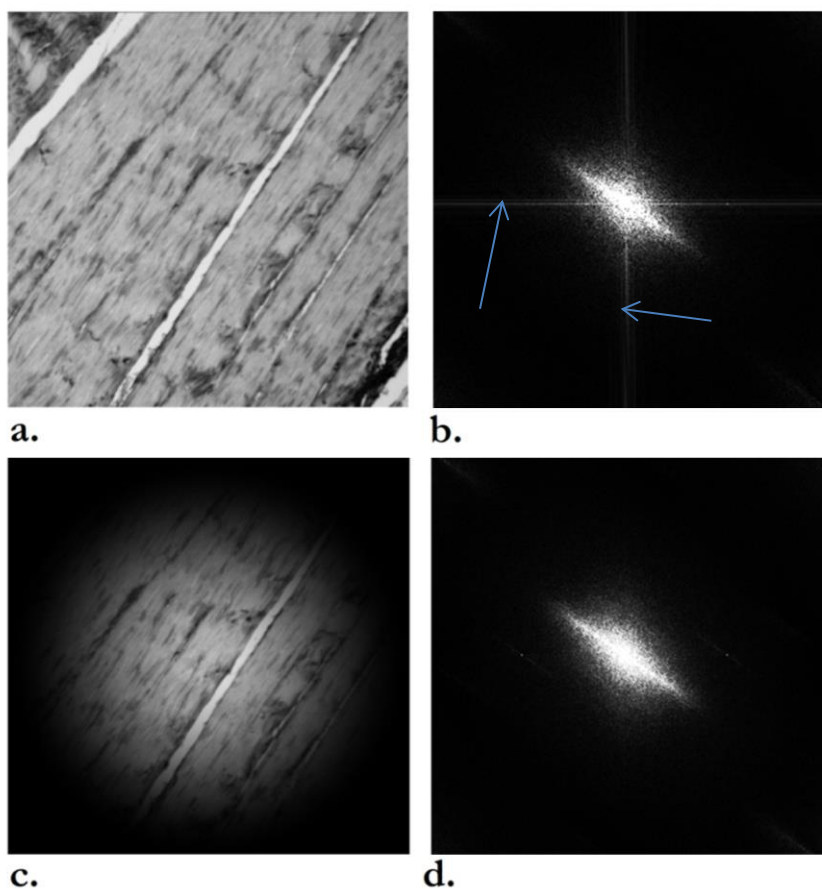
Obrázek 33. Schéma postupu pro určení výsledného úhlu pootočení ω

Před samotným provedením FFT je nutné použít vhodnou funkci, která postupně snižuje intenzitu směrem k okrajům mikrosnímku. Těchto funkcí existuje celá řada, nejčastěji se používá Barlettova, Hanningova (viz Obrázek 34c), Hammingova, Blackmannova atp. Někdy se tyto funkce označují jako tvarová okna. V rámci všech dalších analýz bylo Hanningovo okno s předpisem

$$f(m, n) = \begin{cases} \frac{1}{2} \left[1 + \cos \left(\frac{\pi q}{0.5 a} \right) \right] & q < \frac{a}{2} \\ 0, & q \geq \frac{a}{2} \end{cases}, \quad (19)$$

kde $m, n = 1 \dots a$; symbol a představuje délku hrany čtvercového obrazu v pixelech a $q = \sqrt{(a/2 - m)^2 + (a/2 - n)^2}$ je pixelová vzdálenost od středu mikrosnímku.

Ačkoliv se tímto oknem odstraní i jisté procento obrazu, které nebude dále analyzováno (kolem 22 % při použití rovnice (19)), cílem je, že se odstraní především vysoké frekvence, které by vznikly z hran mikrosnímku a které by později silně ovlivnily analýzu vzniklého histogramu, viz Obrázek 34. Tento problém podrobně popisuje (Ayres et al. 2008).



Obrázek 34. Mikrosnímek Achillovy šlachy a frekvenčních oblastí. Mikrosnímek a. zobrazuje oříznutý obraz Achillovy šlachy (rozměry oříznuty na čtverec 960×960 px). Obrázek b. zobrazuje jeho amplitudo-frekvenční oblast s viditelným křížem frekvencí plynoucích z hran mikrosnímku (označeny šipkami). Snímek c. zobrazuje snímek a. ale s přidanou Hanningovou funkcí. Obrázek d. zobrazuje jeho amplitudo-frekvenční oblast. Obě amplitudo-frekvenční oblasti nejsou otočeny o 90°.

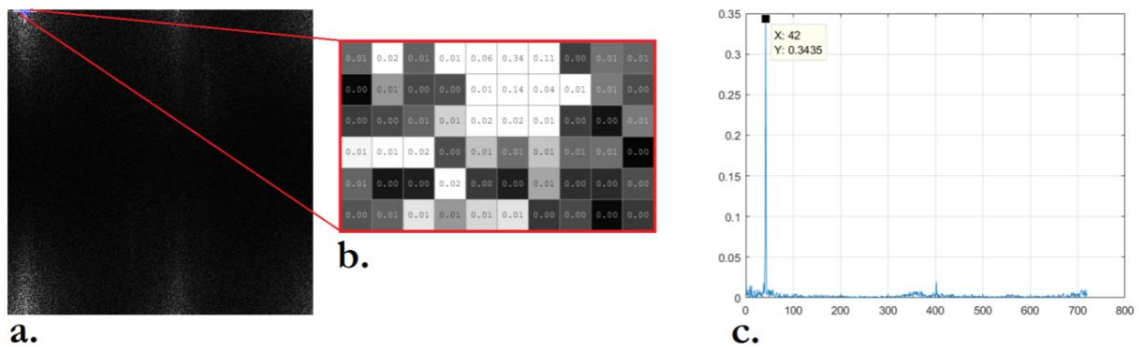
Po tomto kroku je možné aplikovat první 2D FFT na výpočet amplitudo-frekvenčního spektra $|F(u, v)|$ podle

$$|F(u, v)| = \left| \frac{1}{a} \sum_{m=0}^{a-1} \left[\frac{1}{a} \sum_{n=0}^{a-1} e^{(-2 \cdot \pi \cdot i \cdot n \cdot v / a)} \cdot A(m, n) \right] \cdot e^{(-2 \cdot \pi \cdot i \cdot m \cdot u / a)} \right|, \quad (20)$$

kde $m, n = 1, \dots, a$; symbol a zde popisuje pixelovou velikost čtvercového obrazu $A(m, n)$. Stojí za to zmínit, že amplitudo-frekvenční spektra, viz Obrázek 34b a d, jsou vůči skutečné orientaci struktury otočena o 90° .

Nejelementárnější představa o tom, proč musejí být obrázky otočeny o 90° je následující. Fourierova transformace využívá Fourierovy řady, které obsahuje periodické funkce sinus a cosinus. A právě pro popis signálu jsou tyto funkce využity (ač přepsány do komplexních čísel, viz např. rovnice (20)). Samotné vlákno v obraze (jeho orientace) je pak dáno vrcholky těchto funkcí ale osa funkcí (dominantní formace bodů) je kolmá na původní vlákno. Z toho důvodu je tedy nutné obrázky otáčet o 90° (nezáleží na směru rotace). Neotočené amplitudo-frekvenční oblasti viz Obrázek 34b. a d.

Dále je nutné provést přenásobení amplitudo-frekvenčního spektra (viz Obrázek 34d, zatímco předchozí násobení Hanningovým oknem se týkalo původních obrazů, viz Obrázek 34a) Hanningovým a inverzním Hanningovým oknem, aby byly z analýzy vyloučeny nereálné řádově odlišné frekvence pocházející z krajů obrazu a středu obrazu. Obrazy pak mohou být převedeny do polárních souřadnic. Pokud chceme nastavit dělení úhlu na méně než jeden stupeň, zavedeme dělicí parametr, například s . Výsledný obraz je pak rozměrově v násobcích 360° . Při $s = 2$ je dělení na půl stupně s rozměry 720×720 bodů. Obrázek 33 dále udává, že stačí provést další FFT a sestavit rovnici pro fázovou korelaci. Při inverzní transformaci lze již finálně obdržet výkonové spektrum. V tomto výkonovém spektru reprezentují řádky změnu měřítka. Protože však byly všechny snímky pořízeny při stejném zvětšení, zajímá nás pouze první řádek.

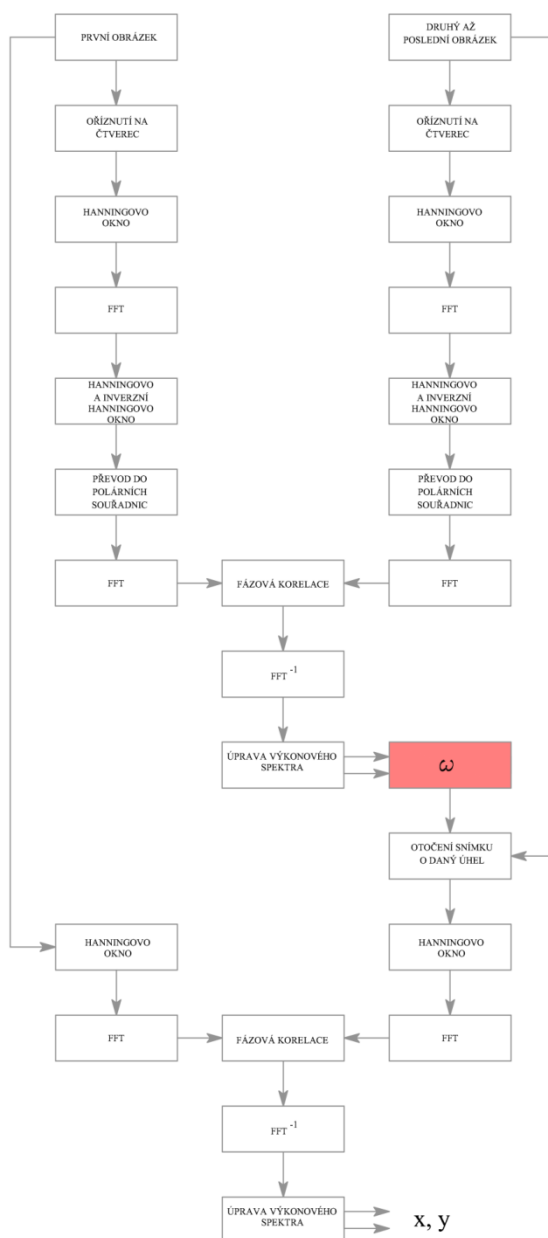


Obrázek 35. Grafický popis získání úhlu rotace. Obrázek (a.) ukazuje výkonové spektrum, kde jsou všechny hodnoty převedeny do absolutních hodnot. Obrázek (b.) ukazuje bodový detail v místě, kde se vyskytuje maximální hodnota 0.3435. Graf (c.) ukazuje všechny hodnoty z prvního řádku – pozice x odpovídá číslu 42.

Následně sloupec s první nejvyšší hodnotou určuje úhel, o který je nutné každý druhý a následný obraz otočit tak, aby seděl s obrazem prvním. Přesnost jeho určení je dána zvoleným dělicím parametrem s . Výsledný úhel je vypočten pomocí vztahu

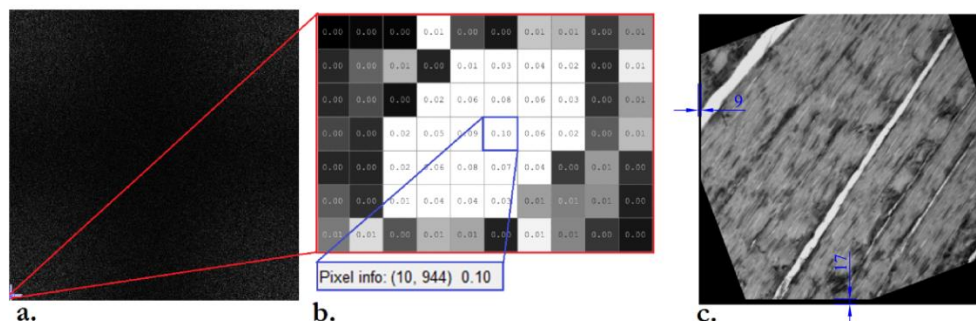
$$\omega = \frac{x}{s} - \frac{1}{s}, \quad (21)$$

kde x odpovídá pozici maximální hodnoty v prvním řádku výkonového spektra a s je parametr dělení, v našem případě 2. Jednička představuje korekci, neboť nulový úhel koresponduje s prvním sloupcem, nultý sloupec neexistuje. Výsledný úhel $\omega=20,5^\circ$. Je nutné poznamenat, že kromě úhlu otočení bylo nutné získat i souřadnice posunu. Mírný posun nastává vlivem bočního tlaku operátora na otočný stůl. Ačkoliv je tento posun velmi malý, pixelově je již významný. Schéma výpočtu je opět uvedeno na obrázku 36.



Obrázek 36. Schéma postupu pro určení výsledného posunu v osách x a y .

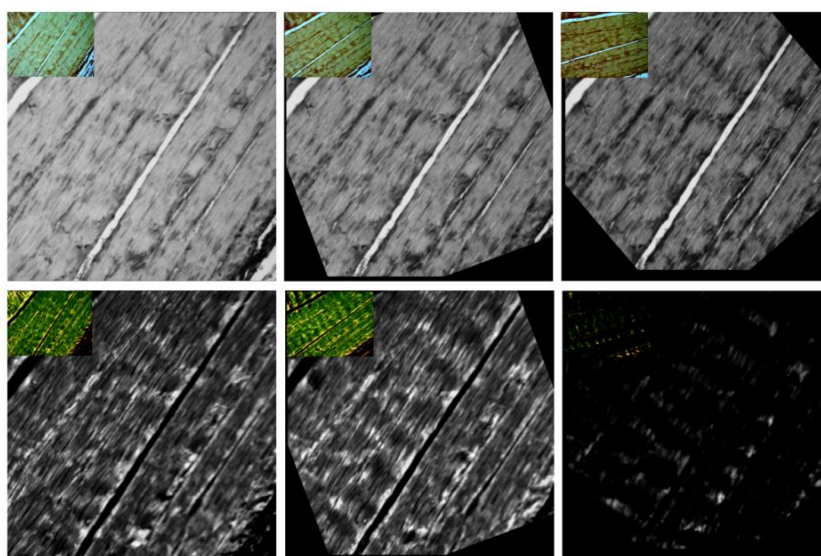
Na snímek otočený o úhel ω a na první snímek se opět aplikuje Hanningovo okno a použije se FFT. Sestaví se rovnice fázové korelace a provede se její inverzní FFT. Výsledkem je opět obraz výkonového spektra (tentokrát plný obraz 960×960 bodů). Řádek a sloupec tohoto výkonového spektra uvádí posun středu (těžiště) obrázku, viz Obrázek 37.



Obrázek 37. Získání hodnot posuvu obrázku. Obrázek (a.) ukazuje výkonové spektrum, kde se v levém dolním rohu vyskytují body s nejvyšší hodnotou. Řádek a sloupec naznačují posun druhého a každého následného obrázku vůči obrázku prvnímu. Je důležité zmínit, že skutečný posuv je o jedničku snížen a výsledná hodnota posuvu je pak 9 bodů v ose x a 17 bodů v ose y ($960-943$) – viz snímek (c.).

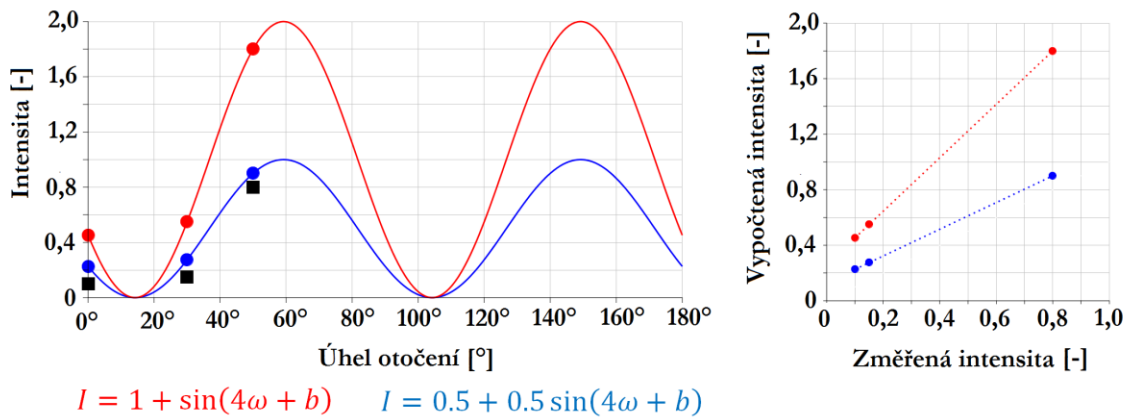
Protože se jedná o posuv středu obrázku, z výkonového spektra nemusí být jasné, kterým směrem se tento posuv má zpětně provést. Je proto nutné druhý a následný mikrosnímek rozdělit na 4 kvadranty a v každém tomto kvadrantu hledat pixelovou shodu. Pokud je pixelová shoda v některém z těchto kvadrantů nalezena, obraz je tímto směrem posunut.

Ačkoliv to dříve v textu nebylo zdůrazněno, hledaná rotace a hledané posuvy jsou získávány z nepolarizovaných mikrosnímků, neboť u nich nedochází k významné změně intensity, která by mohla sesazení obrazů zcela pokazit (nebyla by nalezena shoda mezi obrazy). Jakmile tedy jsou hodnoty úhlu a posuvů získány pro nepolarizované mikrosnímky, mohou se velmi jednoduše převést na polarizované mikrosnímky. Výsledek viz Obrázek 38.



Obrázek 38. Kompletně sesazené mikrosnímky. Nepolarizované v horní řadě, polarizované ve spodní řadě. Sub-snímky symbolizují vzájemně otočené (po směru hod ručiček) a posunuté snímky (v posledním snímku nezřetelné kvůli značné míře vyhasnutí v polarizovaném světle).

Nezávislost funkcí na jejich amplitudě demonstruje Obrázek 40.



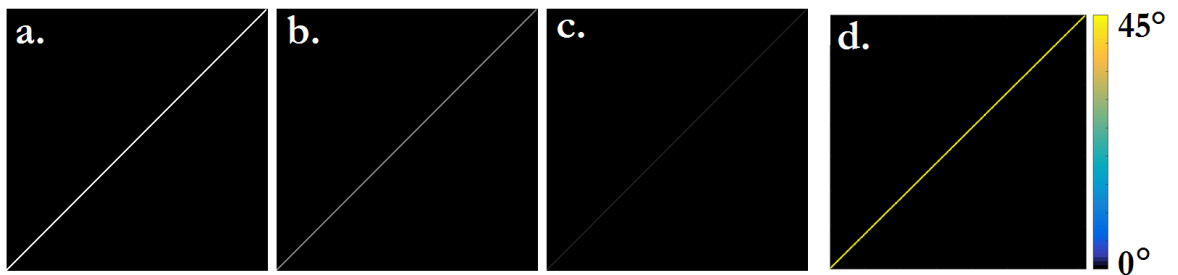
Obrázek 40. Grafické zobrazení navržených funkcí (22) a (24) určené pro predikci změny intenzity. Hodnota Pearsonova koeficientu ($r=1$) zůstává nezměněna pro změnu amplitudy funkcí, respektive sklonu korelační křivky mezi naměřenou a predikovanou intenzitou. Jinými slovy nezáleží na amplitudě navržené periodické funkce!

11.3 VERIFIKACE ALGORITMU

Verifikace je jistý druh kontroly, zda se v navrženém algoritmu nevyskytují numerické a programátorské chyby (zda je skutečně naprogramován podle principu polarizované mikroskopie a zda je schopný korektně predikovat úhel vyhasnutí). K verifikaci byla vytvořena série obrázků různých čar a křivek. Tyto obrázky se měly vzájemně pootočit a měla se u nich změnit intenzita čar – simulace manuálního způsobu měření. Avšak bilineární interpolace mezi pootočenými obrazy způsobovala, že dříve jasné a ostré čáry byly rozmazané. Proto bylo nakonec postupováno tak, že obrazy zůstaly stále na jednom místě, ale měnila se pouze jejich intenzita. Díky tomu nemusela být využita fázová korelace k určení úhlu pootočení. Pro změnu intenzity byl použit vztah (25) a výsledek je zřejmý z Obrázek 41.

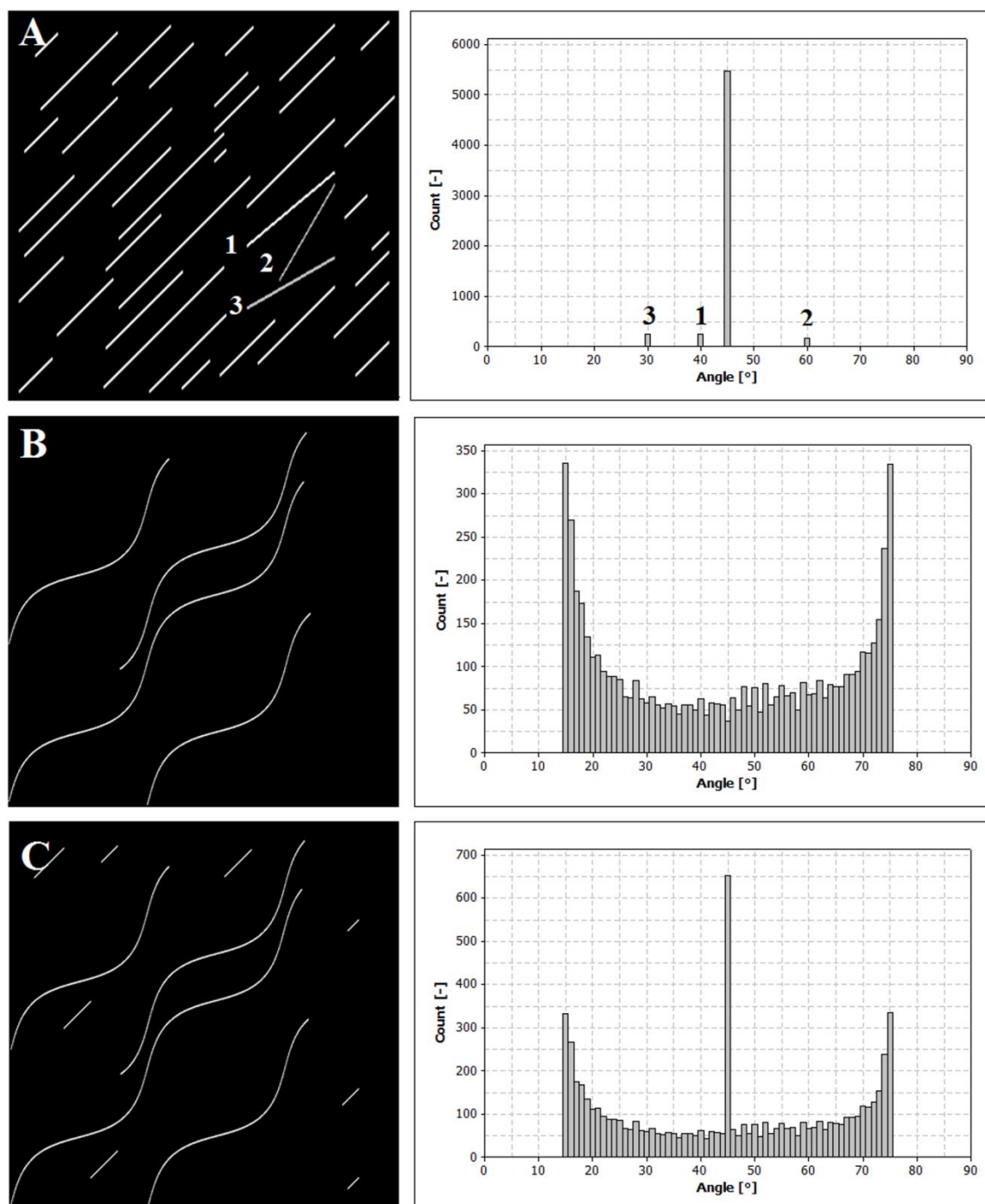
$$I_i = 0.5 + 0.5 \sin[4(AI + \omega_i) - 90] = 0.5 + 0.5 \cos(4\omega_i) \quad \text{pro } i = 1, 2, 3, \quad (25)$$

kde AI [angle of inclination] reprezentuje lokální úhel sklonu pixelů a ω_i reprezentuje fiktivní úhel pootočení.



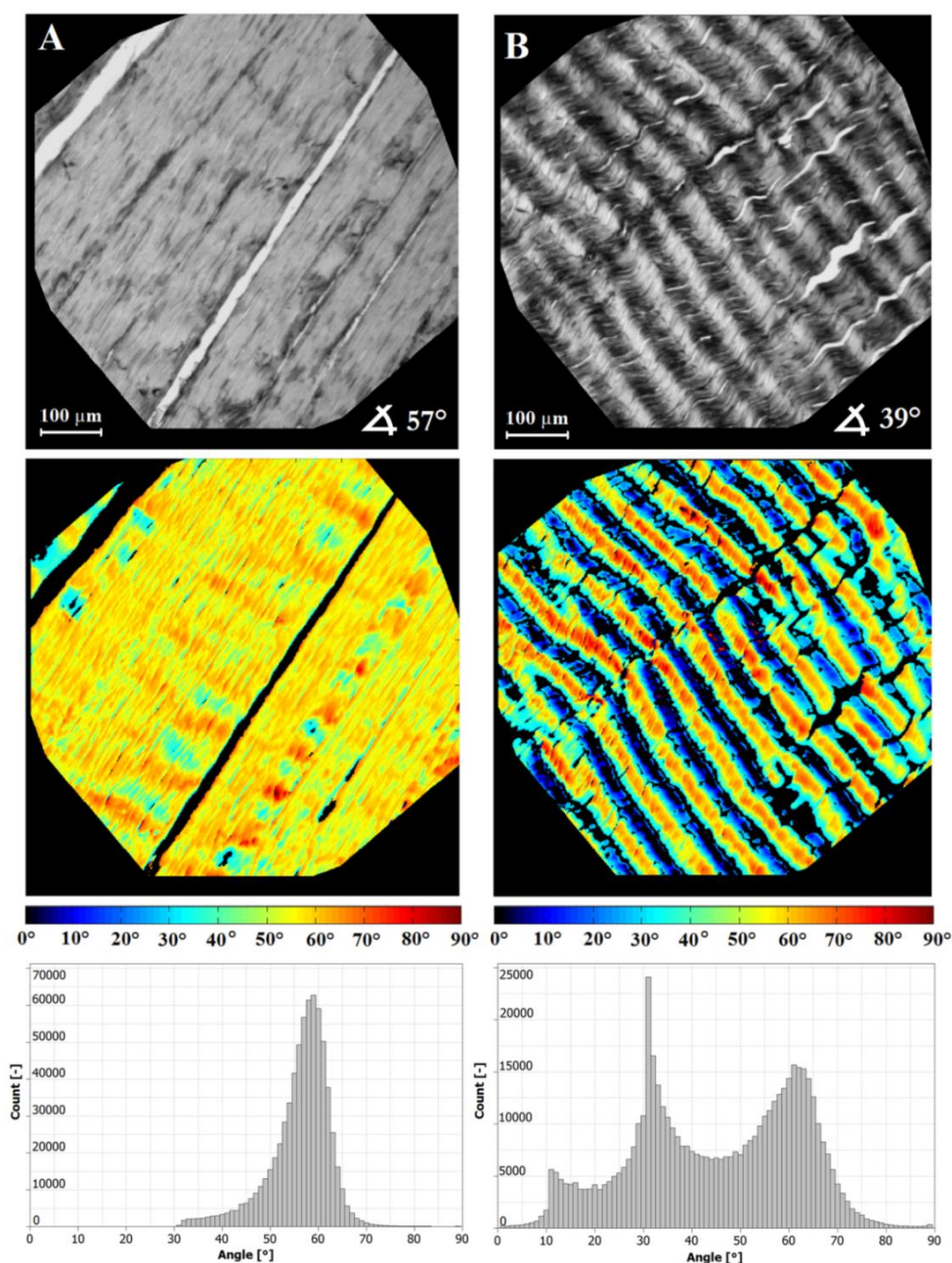
Obrázek 41 Změna intenzity v závislosti na virtuálním otočení jednotlivých snímků a výsledný zpracovaný obrázek. Obrázky (a.), (b.) a (c.) představují virtuálně otočené snímky pro úhly AI = 0°, 22,5° a 35°. Tomu odpovídají vypočtené intenzity $I = 1, 0,5$ a $0,116$. Snímek (c.) dosahuje téměř vyhasnutí, které nastává při úhlu AI = 45° – tomu odpovídá zpracovaný snímek (d.). Snímky mají velikost 360×360 px.

Stejným způsobem byly vytvořeny i složitější umělé obrázky představující nejprve rovná vlákna, zvlněná vlákna a zvlněná vlákna v kombinaci s rovnými vlákny jak dokumentuje Obrázek 42.



Obrázek 42. Analýzy umělých obrazů. Počet [count] reprezentuje počet pixelů s příslušným úhlem sklonu vlákna. Obrázek (a.) je sestaven jen z rovných čar s největším procentuálním zastoupením čar pod úhlem 45°. Stejnou skutečnost zobrazuje i vyhodnocený histogram. Obrázek (b.) je sestaven z čar pod stejným úhlem, které jsou však zvlněny ve tvaru sinusovky. Nejčastěji zastoupené úhly podle histogramu jsou zde vzestupná a sestupná část vlny. Do obrázku (c.) byly přidány rovné části pod úhlem 45°, které následně znesnadňují vyhodnocení jeho histogramu. Převzato z (Novak et al. 2015).

Analýza výše zobrazených obrázků přinesla zajímavé výsledky. Bylo zjištěno, že pokud jsou vlákna reprezentována idealizovanou sinusovou vlnou a jsou skloněna pod úhlem 45° , úhly v histogramu budou nejčastěji zastoupeny vzestupnou a sestupnou částí této vlny, zatímco globální směr vláken bude reprezentován v histogramu svým minimem. Pokud byly do obrazu se zvlněnými vlákny přidány ještě rovné části, minimum v histogramu je překryto těmito vlákny a naopak globální směr je dán procentuálně nejvyšším počtem hodnot. Prakticky to však u reálných snímků znesnadňuje odlišení vlnitosti vláken od jejich globálního směru, jak ukazuje Obrázek 43.



Obrázek 43. Typické rozložení lokálních orientací vláken v reálné struktuře Achillovy šlachy. Snímek A byl vybrán z důvodu snadné interpretace histogramu, protože obsahuje převážně rovná vlákna. Snímek B představuje opačný extrém, protože obsahuje převážně vlákna zvlněná. V pravém dolním rohu mikrosnímků A a B je uveden ručně změřený globální úhel vláken. Převzato z (Novak et al. 2015)

Z výše uvedeného obrázku je vidět, že analýza reálné tkáně dopadla opět podle očekávání a velmi podobně jako u umělých obrazů. Byla-li na mikrosnímku A převážně rovná vlákna skloněná dominantně pod úhlem 57° , na histogramu je vidět odpovídající vrchol s jistou disperzí. Byla-li však vlákna zvlněná, ale neměla tvar ideální sinusovky, takže obsahovala i část rovných vláken, histogram je reprezentován třemi vrcholy. Je tedy velmi složité stanovit dominantní globální směr vláken, který byl manuálně změřen a odpovídal $\sim 39^\circ$. Verifikace však splnila svůj účel a algoritmus poskytuje očekávané a vysvětlitelné výsledky – v algoritmu nejsou chyby.

11.4 VALIDACE ALGORITMU

Algoritmus byl dále validován experimentem, a sice manuálním měřením dvou operátorů, označených A a B, na snímcích Achillovy šlachy a vrstvy medie prasečí aorty z obvodově-radiální roviny. Tato vrstva byla zvolena kvůli nižší disperzi vláken, než jaká je v rovině obvodově-axiální. Každý operátor měřil přibližně 100 bodů na 3 různých mikrosnímcích medie aorty a na 3 různých mikrosnímcích Achillovy šlachy. Za bod byla stanovena oblast 10×10 px – viz Obrázek 21 str. 47, tedy taková oblast, která je operátorem jasně detekovatelná. Je důležité zmínit, že operátoři měřili body nezávisle na sobě a jejich naměřené hodnoty byly vztahovány k navrženému algoritmu. Výsledné odchylky byly statisticky porovnány pomocí neparametrického testu Mann-Whitney s nulovou hypotézou H_0 : *Oba operátoři mají stejnou odchylku vzhledem k algoritmu* a Levenova testu o shodnosti rozptylů s nulovou hypotézou H_0 : *Oba operátoři mají při měření stejný rozptyl hodnot*. Naměřená data viz Tabulka 8 a Tabulka 9.

Tabulka 8. Variabilita orientace kolagenu v medii prasečí aorty určená operátory A, B a automatickým přístupem. Byl vyhodnocen i relativní obsah kolagenu.

Operátor	Vzorek	Manuální přístup	Automatický přístup	Úhlová odchylka		
		Střední úhel [°]	Střední úhel [°]	Střed [°]	směr. odch.. [°]	Obsah kolagenu [%]
A	1	31,4	39,8	-8,4	8,9	31,2
	2	27,8	36,8	-9,0	9,0	26,4
	3	28,6	39,0	-10,4	8,0	25,2
	Průměr	-	-	-9,3	8,6	27,6
B	4	37,0	42,2	-5,2	8,6	24,8
	5	35,0	39,7	-4,7	6,5	38,5
	6	46,2	47,6	-1,4	10,7	35,5
	Průměr	-	-	-3,8	8,6	32,9
Oba	Průměr	34,2	40,9	-6,7	8,6	30,3

Tabulka 9. Variabilita orientace kolagenu v Achillově šlaše cévy získané operátory A, B a automatickým přístupem. V tabulce je vyhodnocen i relativní obsah kolagenu v tkáni.

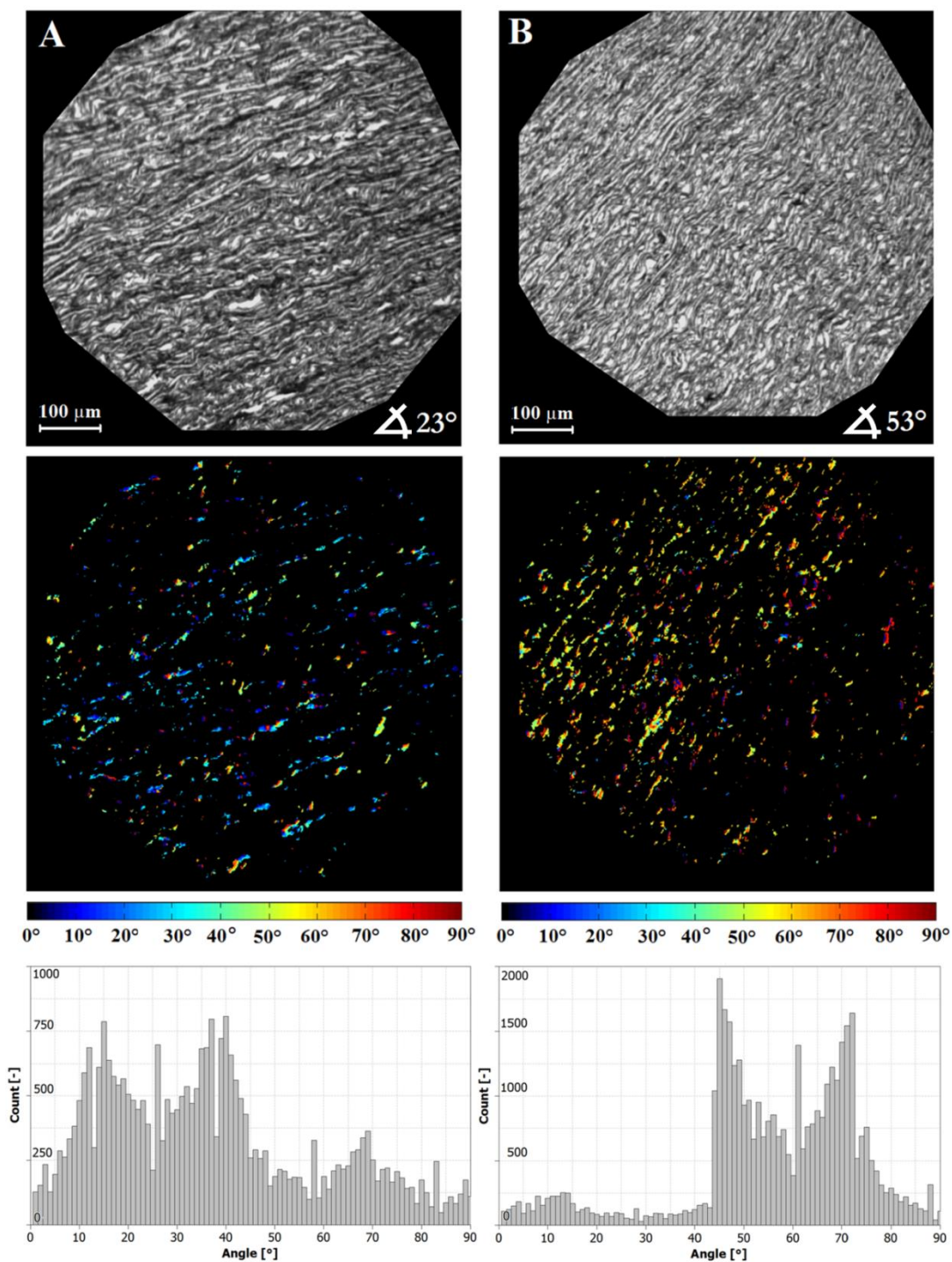
Operátor	Vzorek	Manuální přístup	Automatický přístup	Úhlová odchylka		
		Střední úhel [°]	Střední úhel [°]	Střed [°]	směr. odch. [°]	Obsah kolagenu [%]
A	1	42,4	40,4	1,9	8,2	96,8
	2	18,9	22,3	-3,4	5,3	94,4
	3	22,3	25,1	-2,8	5,7	95,2
	Průměr	-	-	-1,6	6,4	95,5
B	4	69,0	63,5	5,5	9,1	89,3
	5	34,2	33,4	0,8	7,4	96,1
	6	36,4	34,9	1,5	6,9	94,2
	Průměr	-	-	2,6	7,8	93,2
Oba	Průměr	37,2	36,6	0,6	7,1	94,3

Výsledky z tabulky 8 a 9 ukazují, že sledovaný úhlový rozdíl mezi operátory a algoritmem byl celkově negativní, tedy operátoři úhel spíše podhodnocovali. Průměrný úhlový rozdíl pro případ medie prasečí aorty byl pro operátora A $-9,3 \pm 8,6^\circ$ a pro operátora B $-3,8 \pm 8,6^\circ$. To znamená, že operátoři nedosáhli minima funkce – tedy místa, kde je intenzita daného bodu nulová. Příčinou je pravděpodobně nedostatečná citlivost lidského oka, které nízkou intenzitu světla již považovalo za vyhasnutí. Je zajímavé poznamenat, že operátor B, který při měření o tomto riziku již věděl a intuitivně tedy používal jistý korekční faktor, dosáhl podstatně menší odchylky. Pro případ Achillovy šlachy byl úhlový rozdíl pro operátora A $-1,6 \pm 6,4^\circ$ a pro operátora B $2,6 \pm 7,8^\circ$. Operátoři tak dosáhli menší odchylky vůči automatickému algoritmu než při hodnocení tkáně aorty. Tento výsledek je logický, neboť u šlachy jsou vlákna lépe viditelná – viz Obrázek 16, str. 42. Operátoři tak lépe dosáhnou globálního minima funkce – vyhasnutí sledovaného bodu. Závěrem je nutné zmínit, že odchylky mezi operátory byly statisticky významné ($p=0,0001$) ačkoliv směrodatné odchylky byly stejné ($p=0,368$).

Algoritmus byl současně testován, zda je možno s jeho pomocí odhadnout poměrný obsah kolagenu v obou tkáních. Za tím účelem byly vzájemně superponovány intenzity ze třech vzájemně pootočených mikrosnímků. Vznikl tak obrázek s jistým množstvím pixelů s nenulovou intenzitou, reprezentujících kolagen. Toto množství bylo porovnáno s celkovým množstvím všech analyzovaných pixelů. Relativní obsah kolagenu byl vyhodnocen jako $94,3 \pm 2,7\%$ v případě Achillovy šlachy a $30,3 \pm 5,8\%$ v případě vrstvy medie prasečí tepny. Obsah kolagenu v Achillově šlaše je v souladu se studií (Eriksen et al. 2002) a obsah kolagenu v medii prasečí aorty je mírně pod obsahem kolagenu ve studiích (Wolinsky a Glagov 1967; He a Roach 1994; O'Connell et al. 2008), které byly rozepsány v kapitole 2.2.2,

Přesnější validace algoritmu pro tento účel by byla možná histologickým stanovením obsahu kolagenu, což však nebylo součástí této práce.

Grafická podoba analyzovaného vzorku č. 2 a 6. prasečí aorty – medie, je zobrazena na obrázku níže, viz Obrázek 44.



Obrázek 44. Typické výsledky z analýzy druhého (A) a šestého (B) vzorku medie prasečí aorty. V porovnání se vzorkem Achillovy šlachy je celkově analyzováno méně bodů avšak histogramy ukazují opět dva dominantní vrcholy s minimem někde mezi nimi. V pravém dolním rohu mikrosnímků A a B je uveden ručně změřený globální úhel vláken. Převzato z (Novak et al. 2015).

V obou výsledných histogramech jsou zřetelné dva vrcholy, které by mohly být mylně interpretovány jako dvě osnovy šikmých vláken, tvořící v případě dominantního obvodového směru protisměrné šroubovice, jak to bylo předpokládáno v (Holzapfel et al. 2000). Z předchozích analýz umělých obrazů (viz Obrázek 42) ale i ze samotného obrázku 43A, B je však zjevné, že se jedná o jednosměrně uspořádaná vlákna s jistým zvlněním.

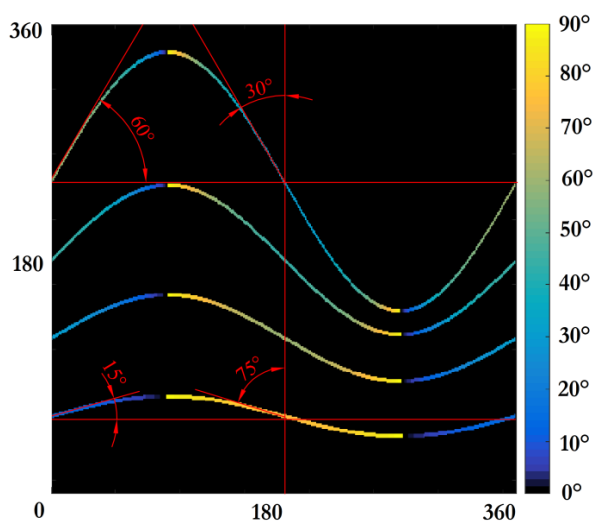
Nutno však přiznat, že vzorky pro Obrázek 44 byly vybrány cíleně, aby umožňovaly jednoznačnou interpretaci histogramů; jejich tvar totiž pro aortální tkáň většinou není tak jednoznačný a rozlišení mezi globálními a lokálními směry vláken, ovlivněnými jejich vlnitostí, vyžaduje další výzkum.

Výše uvedené se nachází také ve studii „Automatic evaluation of collagen fibre directions from polarized light microscopy image“. Autor této dizertační práce se na této studii podílel nominálně 50% (viz záznam VAV ID 114756 v systému Apollo) a konkrétně tento podíl spočíval v návrhu studie, experimentálním měření, tvorbě algoritmu, statistické analýze, podílu na přípravě rukopisu a jeho revizi.

11.5 DISKUSE A OMEZENÍ NAVRHNUTÉHO ALGORITMU

Navrhnutý verifikovaný a validovaný (pro směry, ne pro obsah kolagenu) algoritmus poskytuje tisíce bodů orientací s pixelovou přesností $\sim 0,7\mu\text{m}$. V případě Achillovy šlachy to bylo v průměru 500 tisíc bodů, v případě vzorku medie v průměru 35 tisíc bodů. Celkový čas výpočtu se pohybuje v řádech minut, obvykle 15–30 min v závislosti na množství analyzovaných bodů. Bylo tedy analyzováno nesrovnatelně větší množství bodů, než jaké je schopen naměřit operátor manuálně. Toto množství bodů dává jistý příslib toho, že může být odlišena globální orientace a vlnitost kolagenních vláken.

Největším omezením algoritmu je fakt, že je založen na respektování principu polarizované mikroskopie tak, jak bylo popsáno v kapitole 6 na str. 42. To bohužel znamená, že orientaci kolagenních vláken je možné analyzovat jen tehdy, pokud se pohybuje v rozsahu 0° – 90° . Jinými slovy, při základním nastavení běžného mikroskopu, tj. bez univerzálního rotačního přístroje nebo čtvrtvlnových destiček, nelze odlišit vzájemně kolmé směry v rozmezí 0° – 90° a 90° – 180° . Samotný algoritmus je naprogramovaný tak, že skutečné úhly 0° – 90° jsou měřeny od vodorovné osy, kdežto úhly 90° – 180° jsou měřeny fiktivně znovu od vertikální osy – viz Obrázek 45.



Obrázek 45. Limitace algoritmu dokumentovaná na idealizovaném zvlněném vlákně

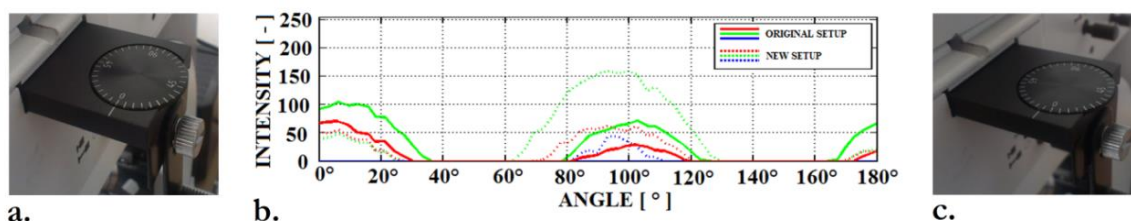
Autorovi této disertační práce se však podařilo zjistit, že vzájemné pootočení analyzátoru vůči polarizátoru může vést k podstatnému rozšíření algoritmu v rozsahu 0° – 180° , tedy k rozlišení vzájemně kolmých směrů. Podstata úpravy mikroskopu a algoritmů bude diskutována v kapitole 12.

12 ÚPRAVA NASTAVENÍ MIKROSKOPU A ALGORITMU

Podstata úpravy nastavení mikroskopu spočívá ve změně vzájemné polohy mezi analyzátozem a polarizátorem. U původního nastavení jsou analyzátor a polarizátor vzájemně kolmé. Za předpokladu vzájemného pootočení analyzátoru vůči polarizátoru, viz Obrázek 46, je možné pozorovat dva jevy:

1. Je propuštěna modrá část barvy s periodou 180°
2. Dochází k podstatnému zvýšení intenzity zelené barvy taktéž s periodou 180° .

Tyto dva jevy představují vhodné kandidáty na pomocné podmínky jak rozlišit úhly mezi vzájemně kolmými směry v mezích 0° – 90° a 90° – 180° . Protože se modrá barva původně zdála být univerzálnější, algoritmus byl podle toho upraven a je diskutován dále.



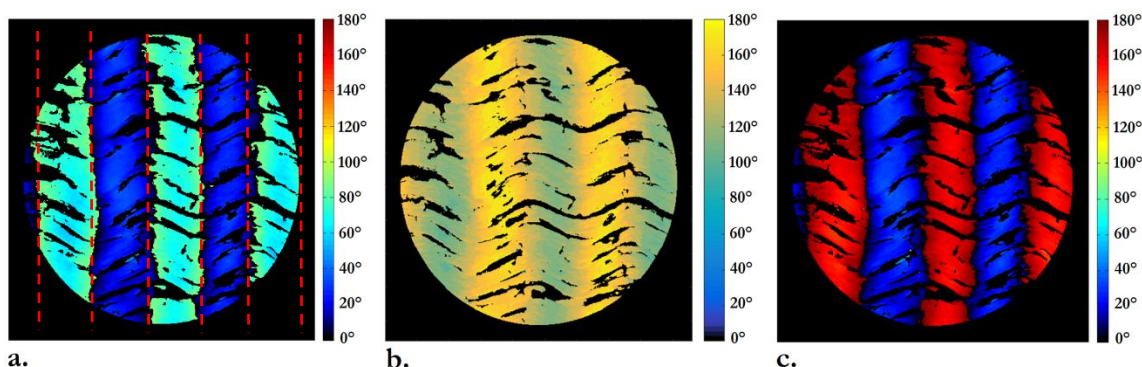
Obrázek 46. Nastavení analyzátoru vůči polarizátoru a důsledek tohoto nastavení. Snímek (a.) ukazuje analyzátor, který je kolmo k polarizátoru (symbolizováno nulou). Průběh všech tří barev světelného spektra z vybraného bodu snímku (snímek nezobrazen), který byl rotován o 180° po 3 stupních je na snímku (b.) označen plnými čarami [original setup]. Snímek (c.) ukazuje analyzátor, který je od kolmého směru vůči polarizátoru pootočen o 5° . Průběh intenzity barev při tomto nastavení je na snímku (b.) znázorněn tečkovanými čarami [new setup]. Je zřejmé, že pro úhly v okolí 0° modrá barva chybí, zatímco pro úhly v okolí 90° naopak vykazuje nejvyšší intenzitu (díky periodicitě 180°).

Je důležité zmínit, že tento jev lze pozorovat u všech polarizačních mikroskopů, u kterých je možnost otáčet buď s analyzátozem, nebo polarizátorem. V našem případě bylo otáčeno analyzátozem, neboť umožňoval úhel otočení kvantifikovat.

12.1 PRINCIP ÚPRAVY ALGORITMU NA MODROU BARVU

Podstatou úpravy je nyní oddělené sledování intenzity všech tří barev – červené, zelené a modré. Zvláště je vyhodnocován průběh intenzity červené a zelené a zvláště průběh intenzity modré. Průběh intenzity červené a zelené barvy včetně predikce vyhasnutí je zpracován podle původního algoritmu, tj. je použita funkce (23) nebo (24) u které je měněn fázový posuv do maximálního Pearsonova korelačního koeficientu ($r \rightarrow 1$); pak platí postup viz Obrázek 39. Pro průběh intenzity modré barvy není použita žádná predikční funkce jako u originálního algoritmu nebo algoritmu upraveného na zelenou barvu – viz kapitola 12.4. Vyhodnocuje se jen pozice, tj. úhel, při které intenzita modré barvy dosáhla svého maxima.

Maximální hodnota této intensity se zhruba shoduje s jedním z maxim ostatních barev (červené nebo zelené). K této hodnotě se přičte 45° (posun o půl periody červené a zelené barvy z jejich maxima do minima) a nová hodnota úhlu se porovná s možnými orientacemi plynoucími z analýzy červené a zelené barvy. Těmi se však myslí dvě hodnoty – původní (do 90°) a alternativní neboli k ní kolmá (původní + 90°), viz Obrázek 45. Správná orientace je pak ta, která je blíže nové hodnotě. Vysvětlení ilustruje Obrázek 47 a podrobný popis určení příslušných úhlů v dalším textu.



Obrázek 47. Úprava původního algoritmu. Obrázek (a.) představuje orientace kolagenních vláken z původního algoritmu. Tyto úhly jsou $\sim 20^\circ$ pro vzestupnou část a $\sim 70^\circ$ pro sestupnou část zvlněného vlákna (kvůli periodicitě 90° nerozlišitelný od skutečného úhlu $-20^\circ = 160^\circ$). Obrázek (b.) reprezentuje úhly, kde modrá barva spektra dosáhla svého maxima, tj. $\sim 170^\circ$ a $\sim 110^\circ$. Snímek (c.) ukazuje ve stejné škále jako snímek (a) finální (správné) úhly odpovídající zvlnění symetrickému kolem vodorovného globálního směru vláken.

a) Určení úhlu $> 90^\circ$.

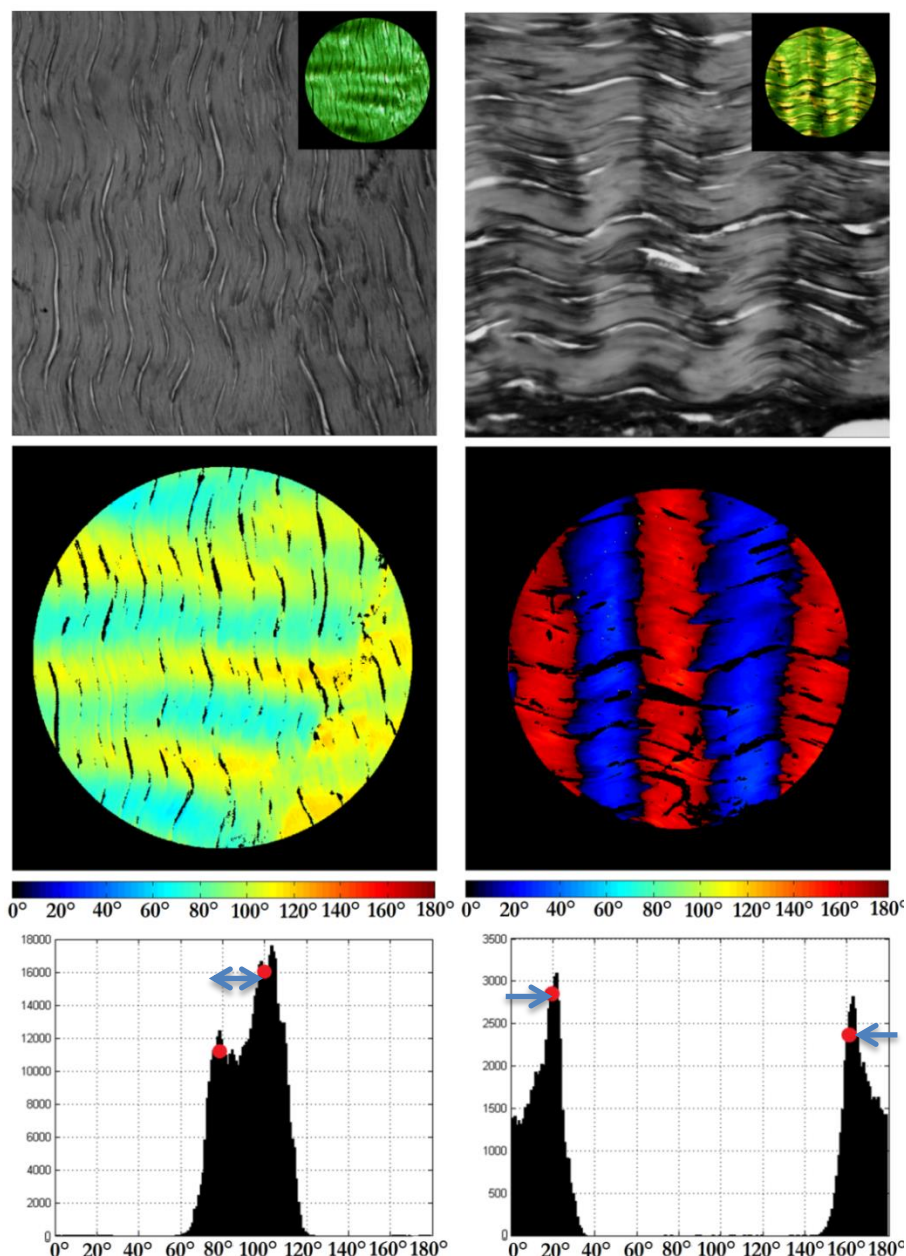
Z původního algoritmu je obdržén Obrázek 47(a.), s úhlem vyhasnutí $\sim 20^\circ$ pro vzestupnou (modrá) a $\sim 70^\circ$ pro sestupnou (cyan) část zvlněného vlákna. Uvedených $\sim 70^\circ$ je zjevně chybná interpretace (skutečný úhel je $\sim 70^\circ + 90^\circ = \sim 160^\circ$). Hodnota tedy musí být korigována podle průběhu intensity modré barvy. Maximální hodnota této intensity je pro sestupnou část zvlněného vlákna při pootočení o $\sim 110^\circ$, viz Obrázek 47(b.). Po přičtení 45° se dostáváme na hodnotu $\sim 155^\circ$. Protože je úhel 160° k 155° blíže než úhel 70° , považujeme za skutečnou orientaci hodnotu úhlu 160° .

b) Určení úhlu $< 90^\circ$

Stejně můžeme postupovat i v případě úhlů pod 90° . Úhel $\sim 20^\circ$ vypadá jako platný úhel, ovšem obecně by mohl být i $110^\circ = 20^\circ + 90^\circ$; ověření může být opět podle modré barvy. Maximální hodnota intensity modré barvy je pro vzestupnou část zvlněného vlákna při pootočení o $\sim 170^\circ$. Po přičtení 45° se dostáváme na hodnotu $\sim 215^\circ$. Pokud nyní odečteme hodnotu 180° (periodicita), pak dostáváme hodnotu $\sim 35^\circ$. Protože je úhel $\sim 20^\circ$ k 35° blíže než možný úhel 110° , považujeme za skutečnou orientaci hodnotu úhlu $\sim 20^\circ$.

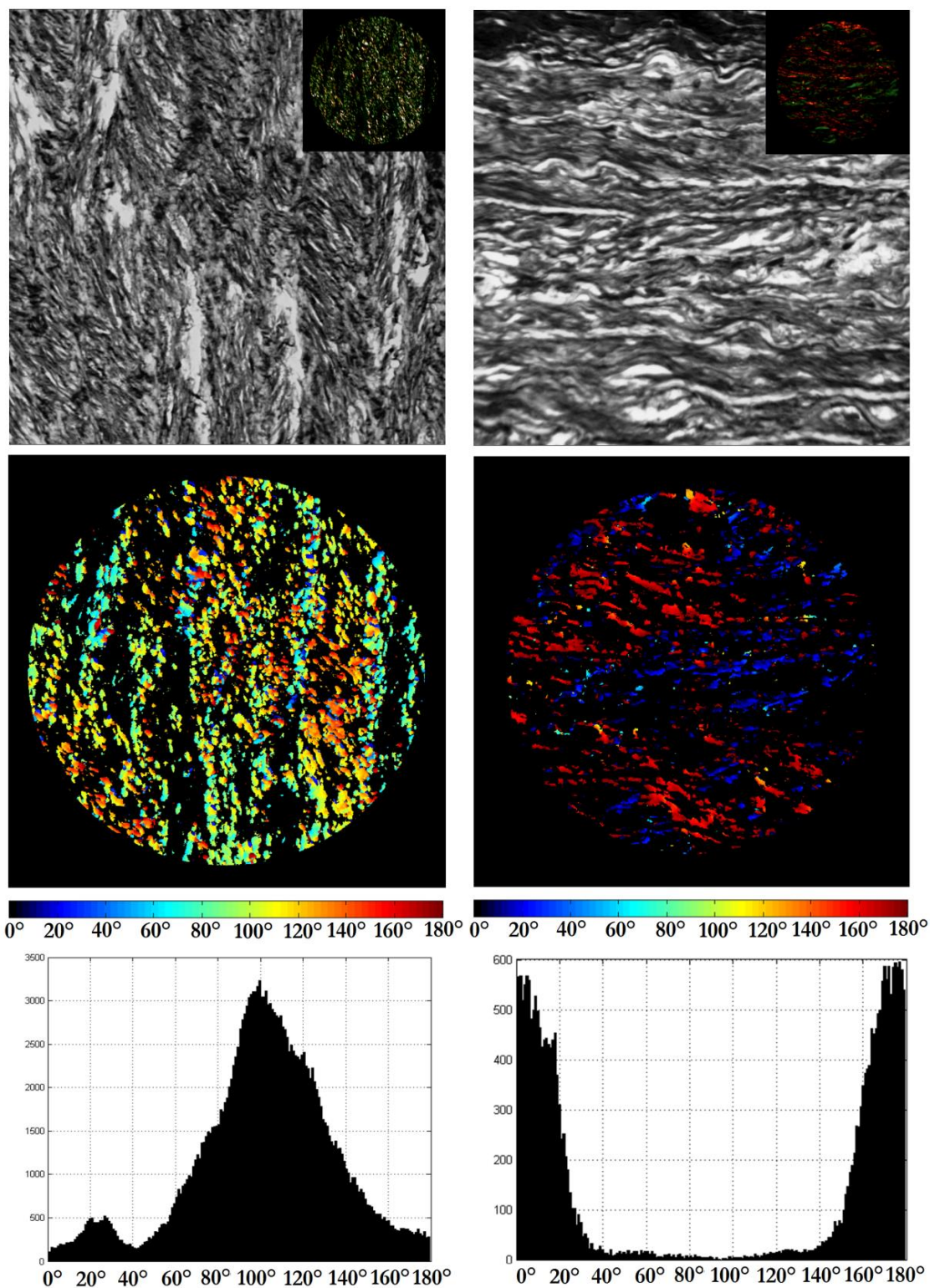
12.2 POSOUZENÍ VĚROHODNOSTI VÝSLEDKŮ

Protože k původnímu algoritmu byla doprogramována podmínka k určení orientace za rozsah 90° , výsledky z upraveného algoritmu bylo nutné posoudit. Na rozdíl od původního algoritmu, v tomto případě nebyly k posouzení vytvořeny umělé obrazy, ale byly použity snímky reálné tkáně. Snímky pocházely z Achillovy šlachy – viz Obrázek 48 a z medie prasete z roviny obvodově-axiální a obvodově-radiální (viz Obrázek 49). Zvláště pak níže zobrazené snímky z Achillovy šlachy umožňovali i manuální měření lokálních směrů.



Obrázek 48. Mikroskopické snímky histolických řezů mírně zvlněných kolagenních vláken v Achillově šlaše. Snímky byly orientovány záměrně tak, aby globální orientace vláken byla 90° (levý sloupec) a 0° (pravý sloupec). Histogramy ukazují dva významné vrcholy lokálních směrů. Ty výborně korespondují s manuálním měřením (červené tečky). Modré šipky ukazují případné odečtení parametru AAU (Tsamitis et al. 2013). Manuální měření: Levý sloupec: lok. směry $76,7^\circ \pm 3,69^\circ$, $104,4^\circ \pm 5,46^\circ$, $w=1,0531 \pm 0,0078$. Pravý sloupec: lok. směry $19,1^\circ \pm 3,99^\circ$, $161,0^\circ \pm 1,26^\circ$, $w=1,0512 \pm 0,0086$.

Z výsledků výše je dobře patrné, že by se v tomto případě dal použít parametr AAU uvedený v kapitole 7.2.1, který by byl, při vhodné korelaci s parametrem vlnitosti w , vhodným kandidátem na to, aby byla vlnitost vláken změřena přímo z histogramů. Bohužel nic takového není vidět při analýze vzorků medie aorty, viz Obrázek 49.



Obrázek 49. Mikroskopické snímky histologických řezů vrstvy medie z obvodově-axiální roviny (levý sloupec) a z obvodově-radiální roviny (pravý sloupec). V levém sloupci obvodový směr odpovídá 90° , zatímco v pravém sloupci to je 0° . Manuální měření orientací a vlnitosti zde bylo shledáno jako neuspokojivé.

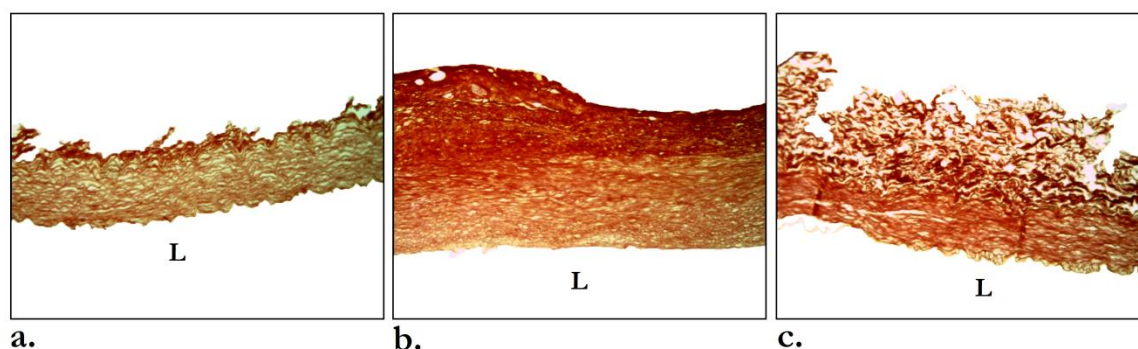
Verifikace algoritmu na mikrosnímčích zvlněných kolagenních vláken Achillovy šlachy (Obrázek 48) dopadla dle očekávání. Pokud byla kolagenní vlákna na mikrosnímku dominantně zvlněna (tvořila téměř sinusovou funkci), algoritmus dokázal detekovat vzestupnou a sestupnou část vlny v plném rozsahu 0° – 180° . Globální směr byl zastoupen v histogramech minimálně. Lokální směry byly dodatečně manuálně změřeny také a jejich velikost byla do histogramů dokreslena ručně. Informace o lokálních směrech z manuálního měření souhlasí výborně s těmi z automatického měření. Výsledky z upraveného algoritmu se tak zdají být věrohodné.

Při použití algoritmu na mikrosnímky medie z prasečí cévy (Obrázek 49) si lze všimnout, že algoritmus opět pracoval v plném rozsahu 0° – 180° . Interpretace výsledků je však složitější a manuální srovnání zde téměř nelze použít. **Snímek v levém sloupci** byl záměrně pořízen a zarovnán tak, aby se co nejvíce blížil snímkům z medie, které byly použity při FFT algoritmu; porovnejte Obrázek 29 - první řádek. Výsledná dominantní orientace kolagenních vláken je tak $\sim 90^{\circ}$, tedy v obvodovém směru se značnou disperzí. Tento výsledek je alespoň kvalitativně v pořádku a vzhledem k tomu, že díky polarizované mikroskopii byla vidět jen kolagenní vlákna, není výsledný histogram téměř ovlivněn šumem. Díky tomu se výsledky z mikrosnímků z polarizované mikroskopie jeví jako výborní kandidáti ke kalibraci exponentu w při použití dříve navrženého FFT algoritmu (viz kapitola 7.1.2). **Snímek v pravém sloupci** byl záměrně pořízen z obvodově-radiální roviny a zarovnán tak, aby dominantní směr byl pod 0° . Ačkoliv se tato rovina jeví jako nejvhodnější k stanovení vlnitosti po tloušťce stěny cévy, žádná významně zvlněná vlákna nejsou viditelná (bíle vypadající zvlněné struktury jsou de facto jen elastinové membrány a ty nejsou v polarizovaném světle detekovatelné). Nicméně kvantifikovat vlnitost z jednoho snímku je nemožné a proto se autor této doktorské práce zapojil do výzkumného úkolu univerzity v Calgary s cílem vlnitost popsat.

12.3 IDENTIFIKACE VLNITOSTI – SOUČASNÝ STAV A OMEZENÍ

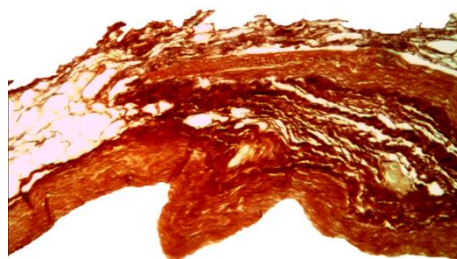
Možnosti stanovení vlnitosti byly tedy zkoumány ve spolupráci s vědeckým týmem v Calgary (E. S. DiMartino, G. Martufi, M. Altamini) na snímcích z abdominální aorty u novozélandského králíka, u nějž se tým pokoušel vytvořit AAA in vivo. Podstatou zde bylo kvantifikování míry přizpůsobení tkáně – remodelace v závislosti na čase. Nejprve byly vzorky odebrány ze „zdravých“ jedinců a označeny jako kontrolní (CO).

Dalším jedincům byla operativně aplikována elastáza (enzym degradující elastin) a vzorky byly odebrány s rozestupem dvou týdnů; označení 2W, 4W a 6W. Histologické řezy byly vytvořeny z obvodově-radiální roviny. Typický vzhled těchto vzorků viz Obrázek 50.



Obrázek 50. Globální vzhled tkáně u třech odlišných vzorků. Mikrosnímek (a.) reprezentuje globální vzhled u kontrolního vzorku – CO. Mikrosnímek (b.) reprezentuje odlišný vzorek ve 4. týdnu -4W. Mikrosnímek (c.) reprezentuje opět jiný typ vzorku v 6. týdnu -6W. Celkově lze vidět jistou podobu mezi kontrolním vzorkem a vzorkem z 6. týdne. Vzorek ze 4. týdne vykazuje těsnější uspořádání vláken. U snímku (a.) chybí zcela náhodně vrstva adventicie, která byla poškozena v důsledku histologického procesu. Lumen (vnitřní strana stěny) je označen písmenem L. Vzorky jsou obarveny PSR barvivem. Zvětšení 100×.

Původně mělo být z každého setu analyzováno 5 vzorků. V každém vzorku měly být provedeny 4 měření – 2× pro vrstvu adventicie, 2× pro vrstvu média. Některé histologické řezy byly však díky histologickému procesu značně porušeny – potrhány nebo ohnuty (viz Obrázek 51). Protože se zdálo, že by takové vzorky mohly ovlivnit celkovou analýzu, byly nakonec vynechány a bylo tak analyzováno jen 72 oblastí. Každá tato oblast vyžadovala (původně) 20 snímků.

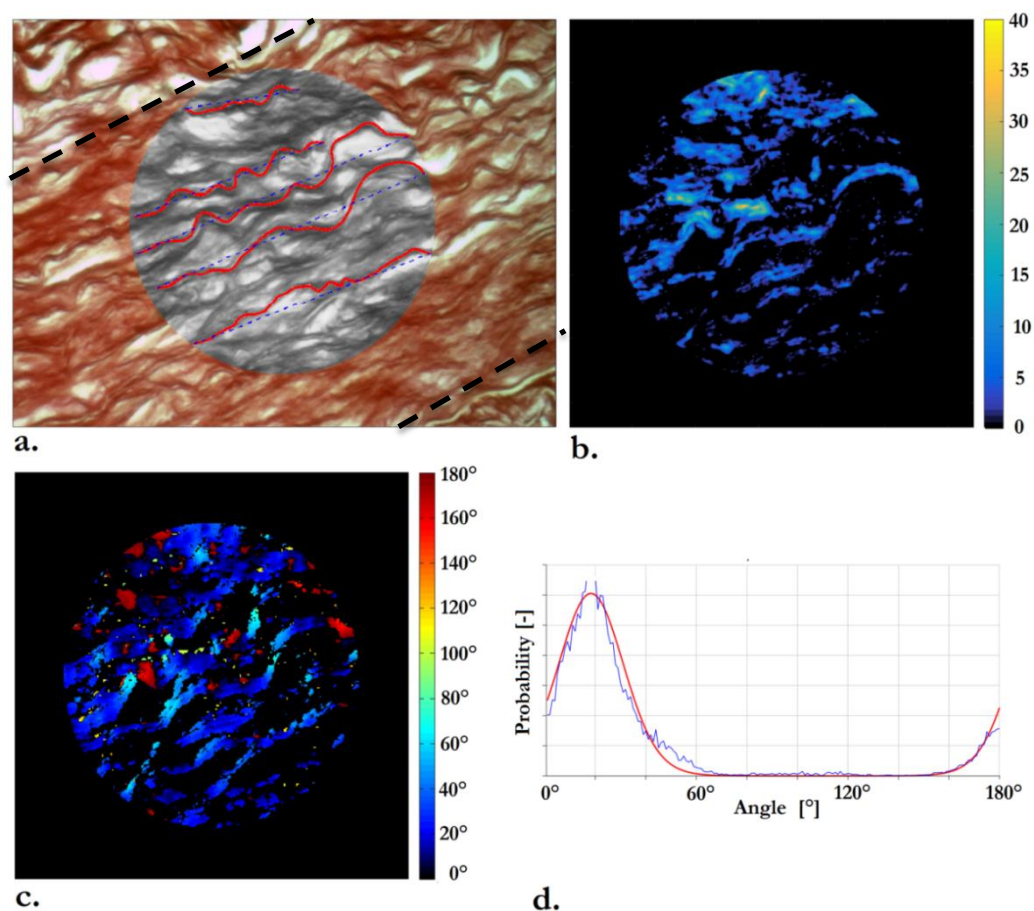


Obrázek 51. Snímek ukazuje blíže neurčitým způsobem poškozený vzorek cévy. Na snímku se téměř nenacházelo homogenní místo, které by mohlo být analyzováno. Takový vzorek byl vyloučen.

I v tomto případě, přes dosavadní výborné výsledky z oblasti Achillových šlach, algoritmus nebyl schopen vlnitost na vzorku králíčí cévy vlnitost rozpoznat, ačkoliv vlákna byla evidentně více zvlněná než v případě prasečí cévy – srovnajme Obrázek 49 a Obrázek 52. Jinými slovy, každý výsledný histogram orientací ukazoval jeden dominantní vrchol související s natočením vzorku (hlavní směr) – viz např. Obrázek 52d. Lokální směry nebyly rozpoznány, ačkoliv vlákna byla zvlněná a vlnitost byla měřitelná manuálním způsobem, viz Obrázek 52a.

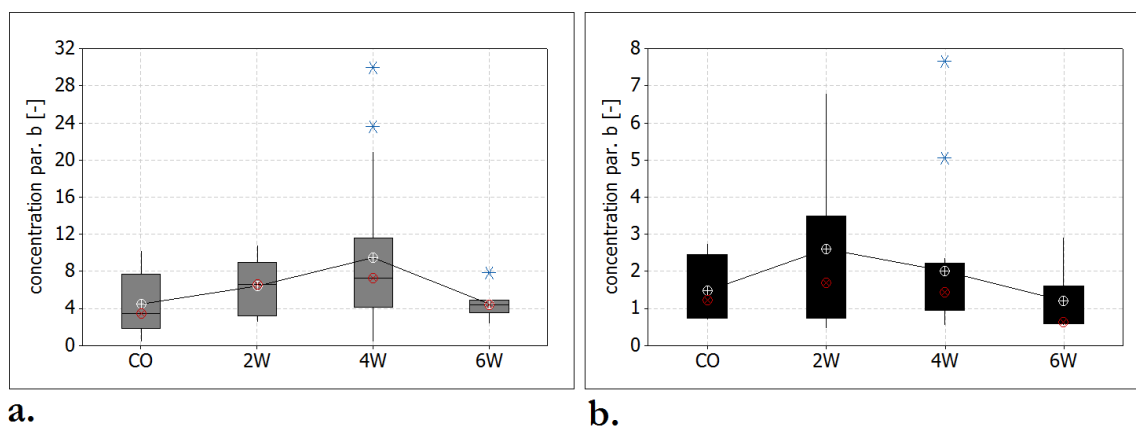
V tomto případě tedy nebylo umožněno spojit parametr AAU s vlnitostí w (parametr AAU byl pro každý vzorek $= 0$ ačkoliv parametr w se měnil). Tento závěr byl bohužel konzistentní u všech analýz histologických vzorků. Toto selhání je možné přičítat náhodnému nesinusovému tvaru zvlněných vláken. Pouze u sinusových tvarů totiž v histogramech jednoznačně dominují směry odpovídající maximálnímu a minimálnímu sklonu zvlněného vlákna. Tento problém se částečně projevil již u histogramů ze zvlněné Achillovy šlachy (viz Obrázek 43), kde nebyly dva jasné extrémy symetricky rozložené kolem globálního směru vlákna, jako tomu bylo u histogramů z umělých idealizovaných obrazů.

Protože vlnitost nebylo tímto způsobem možné kvantifikovat, byl pro její kvantifikaci zkoušen jiný způsob – využití parametru koncentrace b z použité von Misesovy distribuční funkce, viz rovnice (7.1) a (7.2). Pokud jsou vlákna zarovnána v jednom směru, pak parametr $b \rightarrow \infty$. Pokud jsou vlákna distribuována spíše izotropně, pak parametr $b \rightarrow 0$. Všechny snímky ze 72 oblastí byly tedy zpracovány stejně jako Obrázek 52.



Obrázek 52. Ukázka postupného zpracování vzorků králičí abdominální aorty. Mikrosnímek (a.) ukazuje typický vzorek medie králičí AA – 6. týden zaznamenaný v nepolarizovaném světle; manuálně změřená vlnitost $w=1,12$. Obrázek (b.) ukazuje zprůměrovanou intenzitu modré barvy z 20 obrázků v polarizovaném světle zpracovaných navrženým algoritmem. Na základě průběhů intenzit modré barvy je pak zpracován polarizovaný obrázek (c.). Obrázek (d.) pak ukazuje normalizovaný histogram s von Misesovou distribuční funkcí. Parametr koncentrace pro tento příklad nabývá hodnoty $b=5$. Koeficient determinace $R^2=0,97$.

Sumarizované parametry koncentrace b jsou zobrazeny pomocí boxových diagramů na Obrázek 53.



Obrázek 53. Výsledné hodnoty parametru koncentrace b v závislosti na čase pro (CO-2W-4W-6W). Na diagramu (a.) jsou hodnoty parametru b pro medii, na diagramu (b.) jsou hodnoty stejného parametru pro adventicii. Průměrné hodnoty z každé skupiny jsou označeny bílým kolečkem a spojeny souvislou černou čarou. Mediány jsou zobrazeny červeným kolečkem. Hvězdičkami jsou označeny odlehlé hodnoty, které nebyly do vyhodnocení zahrnuty. Tyto odlehlé hodnoty jsou definovány jako ty hodnoty, které leží mimo rozsah $Q_1 - 1,5 \times IQR$ nebo $Q_3 + 1,5 \times IQR$, kde Q_1 a Q_3 jsou I. a III. kvartil a IQR je mezikvartilový rozsah definovaný jako $IQR = Q_3 - Q_1$.

Na boxových diagramech lze vidět, že při vystavení tepny elastáze parametr b nejprve vzrůstá a svoje maximum má ve 4. týdnu u vrstvy medie a ve 2. týdnu ve vrstvě adventicie. Poté se zase vrací do kontrolního (původního - CO) stavu. Pokud tento parametr interpretujeme jako míru zvlnění vláken, může být tento nárůst vysvětlen právě úbytkem elastinu. Kolagenní vlákna se pak totiž stávají jedinou nosnou strukturou a začínají se protahovat. Více je ovlivněna medie, neboť v adventicii je pouze nepatrný výskyt elastinu. Po cca 4 týdnech se stěna sama remodeluje a parametr b opět klesá; vlákna se stávají opět mírně zvlněnými.

Zhodnocení

Algoritmus využívající dodatečné informace o intenzitě modré barvy je navržen platně a dává smysluplné informace o orientaci kolagenních vláken. Algoritmus byl použit pro určení vlnitosti, ale kromě tvarů ideálních sinusových vln nebyla vlnitost zatím kvantifikována. Podstata úpravy mikroskopu a algoritmu vychází čistě z praktického pozorování změny barev při otáčení rotačního stolu, tj. nebylo zde provedeno žádné experimentální měření. To se povedlo až v závěru doktorského studia. Experimentální měření vedlo k novému nastavení mikroskopu a přeprogramování algoritmu, viz kapitola 12.4.

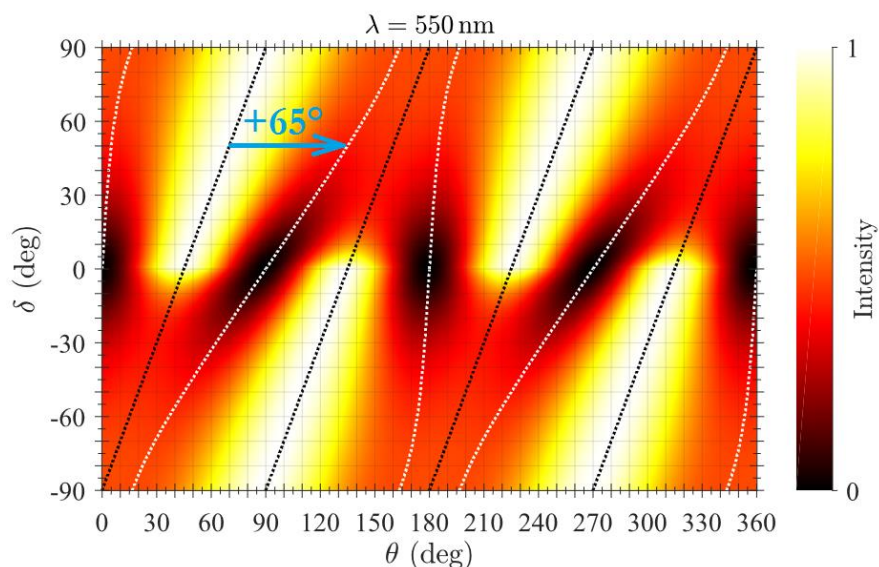
12.4 PRINCIP ÚPRAVY ALGORITMU NA ZELENOU BARVU

V kapitole 12.1 byla popsána úprava algoritmu podle průběhu modré složky světla. Výsledky z algoritmu byly ověřeny vůči manuálnímu měření, např. viz Obrázek 48, byly věrohodné a algoritmus byl využit ve snaze kvantifikovat vlnitost kolagenních vláken. Bohužel samotné nastavení mikroskopu nemělo žádnou teoretickou oporu. Neexistovalo žádné zdůvodnění toho, proč byl analyzátor otočen právě o 5° . Zdůvodnění bylo nalezeno až při nedávné spolupráci s Ing. Petrem Dvořákem a Ing. Martinem Hrtoňem z Ústavu fyzikálního inženýrství (ÚFI).

Díky spolupráci s ÚFI bylo provedeno transmisní měření, tj. byl sledován průběh intensity světla. Tento průběh intensity byl měřen pro několik vlnových délek (v rozmezí 400 nm–900 nm) a možné úhly otočení analyzátoru (-90° – 90°) a rotačního stolu (0° – 360°). Při transmisním měření byly zjištěny následující údaje:

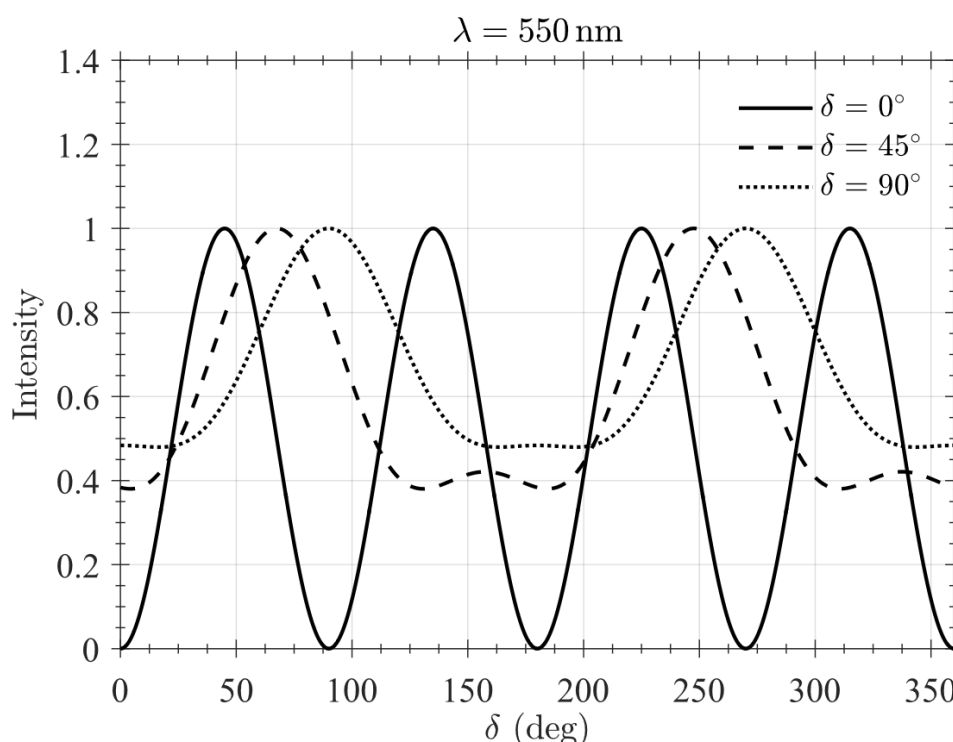
- Anizotropie vláken se nejvíce projevovala při vlnové délce 550 nm.
- Optimální natočení analyzátoru bylo stanoveno na hodnotu $\delta = 50^\circ$; avšak je možné zvolit jiné a algoritmus podle toho upravit.

Pro zmíněnou vlnovou délku 550 nm lze získat různé průběhy intenzit, pro každé natočení analyzátoru představené periodickými funkcemi úhlu natočení vlákna. Obrázek 54 představuje jejich superpozici, kde tmavší místa představují sedla (minima), světlejší místa vrcholy (maxima).



Obrázek 54. Průběh intenzit pro zelenou barvu, tj. pro $\lambda = 550$ nm a různé úhly otočení analyzátoru δ . Světlé části na obrázku zobrazují vrcholy, tj. maximální intenzitu = 1, tmavé části zobrazují sedla, tj. minimální intenzitu = 0. Natočení prvního minima koresponduje s natočením analyzátoru. Bílá tečkovaná čára udává úhel vlákna, při němž nastává minimum intenzity v závislosti na úhlu analyzátoru. Druhé minimum souvisí s natočením polarizátoru. Průběh maxima je popsán rovnicí $\delta = 2 \times \theta - 90^\circ$ (tečkovaná černá čára). Obrázek byl poskytnut Ing. Martinem Hrtoňem.

Při vzájemně kolmých filtrech, tj. $\delta = 0^\circ$ lze vidět řez sinusovou funkcí s periodou 90° ; při úhlu $\theta = 0^\circ + n \times 90^\circ$ lze vidět nulovou intensitu, při úhlu $\theta = 45^\circ + n \times 90^\circ$ je naopak intensita maximální, viz Obrázek 55.



Obrázek 55. Řezy obrázkem 54 pro jednotlivé úhly natočení analyzátoru, tj. pro $\delta = 0^\circ$, pro $\delta = 45^\circ$ a $\delta = 90^\circ$. Jen pro úhel $\delta = 0^\circ$ je dobře patrné, že se jedná o sinusovou funkci. Pro jiná natočení se perioda změnila na 180° a navíc funkce již nejsou sinusové, ale jen periodické. Graf byl poskytnut Ing. Martinem Hrtoňem. Upozornění: Osa x grafu je rozdělena po 12,5 bodech na dílek.

Při zvětšujícím se δ je dobře vidět, že se jedno z minim natáčí a zároveň ruší maximální intensitu mezi nimi (každé druhé maximum se zmenšuje, takže maxima mají periodu 180°). Minimum funkce, které nás stále zajímá s ohledem na původní algoritmus (viz kapitola 11.2) se při zvětšujícím se δ stává „roztáhlé“ a jeho správná detekce je nejistá, neboť v praxi, při otáčení rotačního stolu pořídíme vždy omezený počet snímků = intenzit, tj. nikdy nemáme takový průběh funkcí jako na Obrázku 55.

Aby minimum bylo platně nalezeno, nejdříve se určí maximum a k tomu maximu se přičte určitá úhlová hodnota posunu tak, abychom se přesunuli právě do prvního minima za tímto maximem. Díky experimentálnímu měření kolegů z ÚFI tak víme, že například pro úhel natočení analyzátoru $\delta = 50^\circ$ se maximum intensity nachází pro úhel natočení vzorku $\theta = 70^\circ$ a k nalezení prvního minima musíme přičíst 65° .

Nakonec by mělo být zdůrazněno, že díky oblasti světelného spektra zelené barvy byla v programu k mikroskopu potlačena červená a modrá složka barvy – obrázky se jeví zeleně – viz např. Obrázek 56.

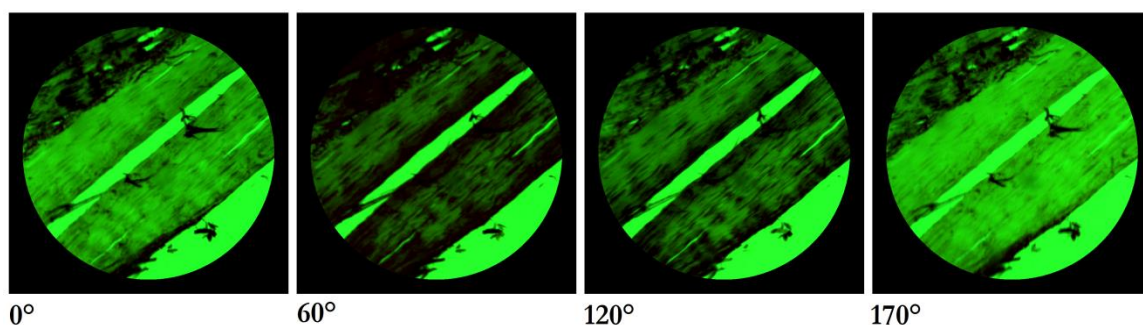
12.4.1 Predikce minima intenzity bodu – úhlu vlákna

Při predikci minima intenzity se může postupovat obdobným způsobem jako v kapitole 11.2, ale místo minima intenzity, která jsou nyní dvě blízko sebe a velmi nevýrazná, hledáme maximum, v jehož okolí se funkce blíží sinusovce a ke kterému je možné přiřadit první minimum přičtením úhlu α , který má pro dané nastavení analyzátoru (tedy $\delta = 50^\circ$) hodnotu 65° (viz Obrázek 54). U výsledných sesazených obrazů je opět možné analyzovat průběh intenzit v každém pixelu (bodě) a určit úhel maxima intenzity. Protože průběh intenzity světla není sinusový, je vhodné opět pořídit 18 mikrosnímků (s rozestupem $\sim 10^\circ$). Funkce, která dobře popisuje okolí maxima v závislosti na natočení vzorku, může být téměř totožná s rovnicí (22), lišící se jen periodou:

$$I = 0,5 + 0,5 \sin(2\omega + b), \quad (26)$$

kde ω je proměnný úhel, b je fázový posuv a ten je opět měněn k získání maximálního r .

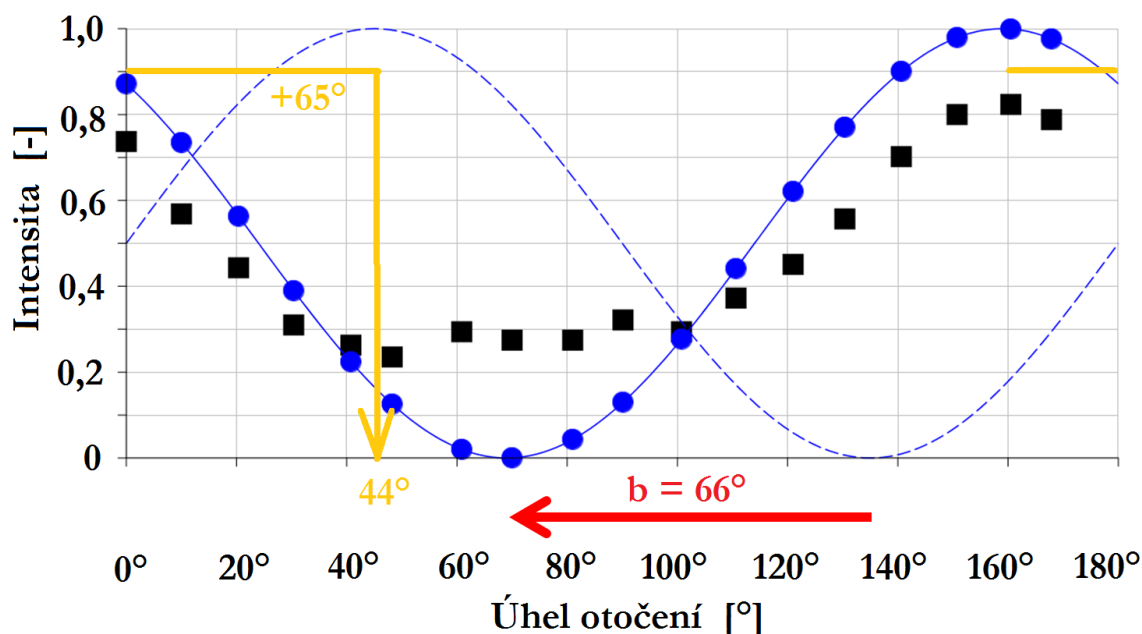
Pro ilustraci postupu jsou použity opět snímky z Achillovy šlachy s téměř rovnými kolagenními vlákny, skloněnými pod $\sim 40^\circ$, viz Obrázek 56.



Obrázek 56. Mikrosnímky Achillovy šlachy s téměř rovnými kolagenními vlákny. Ačkoliv mikrosnímků bylo pořízeno 18 s rozestupem 10° , pro přehlednost jsou zobrazeny jen čtyři s rozestupem $\sim 60^\circ$. Poloha natočení odpovídá postupně 1., 7., 13. a 18. černému bodu v Obrázek 57. Zvětšení $400\times$.

Ze sady 18 mikrosnímků je zaznamenán průběh intenzity zelené barvy (černé body, viz Obrázek 57). U funkce (26) (čárkovaná čára, viz Obrázek 57) je měněn fázový posuv b tak, aby Pearsonův korelační koeficient byl co nejvyšší (ale nikdy nedosáhne jedničky, protože se již nejedná o sinusové funkce). V ilustračním případě dochází k posunu čárkované sinusovky o 66° směrem doleva; $r = 0,95$. Posunutá funkce (plná čára viz Obrázek 57) má své maximum v 159° . Podle experimentálního měření, při zvoleném úhlu $\delta = 50^\circ$ je nutné přičíst 65° k dosažení minima, viz Obrázek 54. Protože se přičtením 65° dostáváme za hranici 180° , odečte se tato hranice od výsledného součtu, tedy $224^\circ - 180^\circ = 44^\circ$.

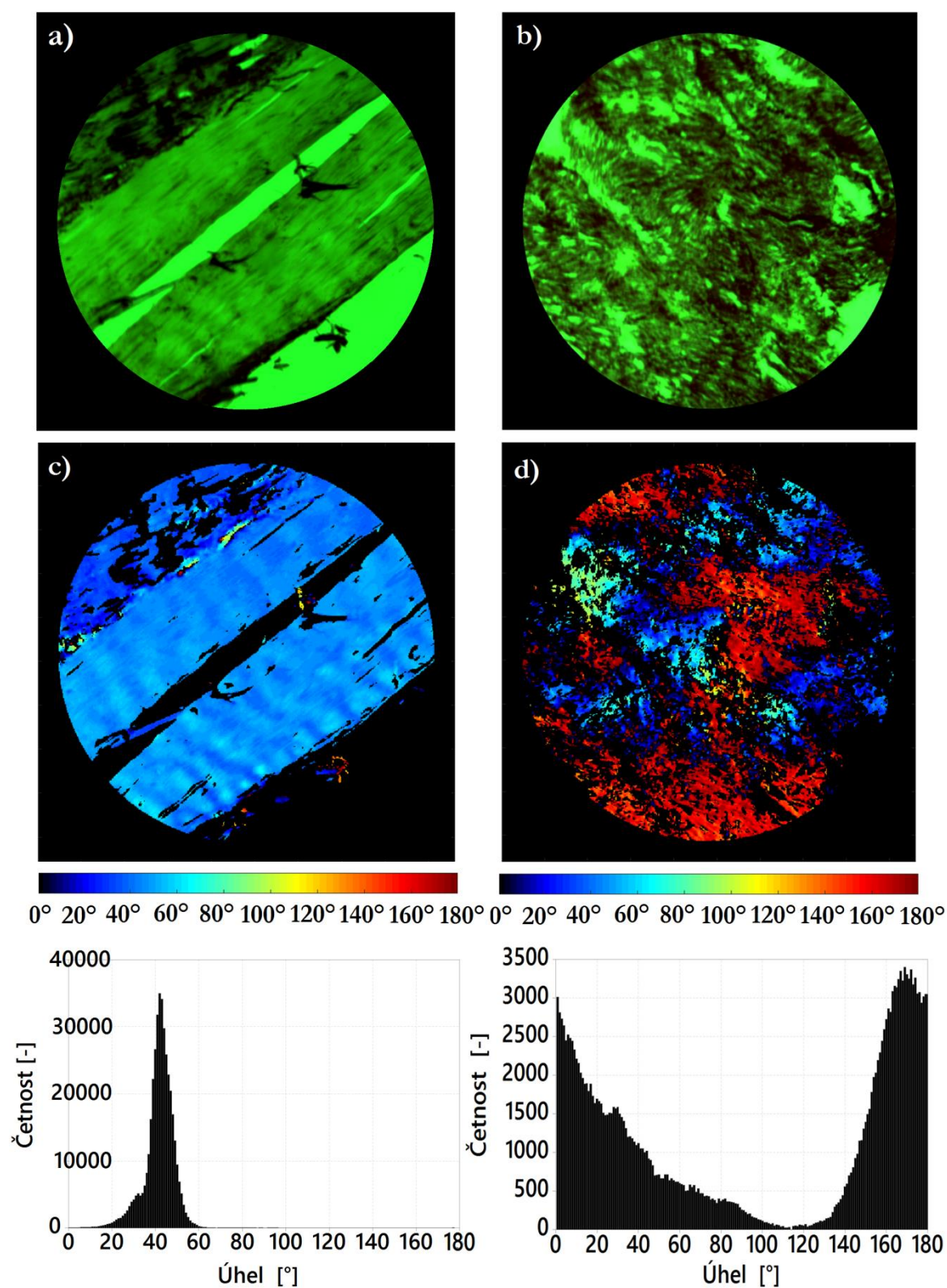
Ačkoliv se může zdát, že tento úhel nesedí s globální orientací ($\sim 40^\circ$), je nutné vzít v potaz, že vlákna nejsou dokonale rovná, ale hlavně v dolní části mírně zvlněná a proto se lokální směry (zde konkrétně 44°) můžou od globálního směru lišit (jinými slovy byl vybrán bod ve vzestupné části zvlněného vlákna a lokální úhel narostl).



Obrázek 57. Grafická interpretace postupu získání směru daného bodu vlákna (vlevo). U funkce (26) představené čárkovanou čarou je měněn fázový posuv ($b \rightarrow 66^\circ$), do maximální hodnoty r (zde $r = 0.95$). U nové funkce, představené plnou čarou, je nalezen vrchol (159°) a k tomuto vrcholu je přičteno 65° (viz Obrázek 54) k nalezení úhlu prvního minima (úhlu vlákna), tj. 44° .

Zpracování 18 mikrosnímků ze dvou odlišných měkkých tkání tj. Achillovy šlachy a medie aorty viz Obrázek 58a). Z tohoto obrázku je zřejmé, že algoritmus, který byl naprogramován na základě experimentálního měření, poskytuje kvalitativně platné výsledky, které je však nutné ještě ověřit na více mikrosnímcích (z odlišných tkání a odlišných rovin). V současné době se o novém nastavení mikroskopu a úpravě algoritmu připravuje impaktovaný článek se spolupracovníky z ÚFI a stejně tak se plánuje provedení verifikace a validace.

Množství analyzovaných bodů přesahuje $10e5$, viz histogramy Obrázek 58, což je řádově více v porovnání s množstvím bodů analyzovaných při ručním měření; připomeňme: ~ 60 (Smith et al. 1981), ~ 16 (Finlay et al. 1995), ~ 50 (Schriebl et al. 2012c), ~ 36 (Gasser et al. 2012) a ~ 30 (Sácz et al. 2016).



Obrázek 58. Zpracované mikrosnímky prasečí Achillovy šlachy (levý sloupec) a medie aorty (pravý sloupec). Mikrosnímek a) ukazuje téměř rovná kolagenní vlákna skloněná globálně pod úhlem ~40°, obrázek c) je zpracovaný mikrosnímek a). Mikrosnímek b) ukazuje různě orientovaná vlákna ve vrstvě medie aorty, obrázek d) je mikrosnímek b), zpracovaný do barvené škály lokálních úhlů vlákna (stěně jako obrázek c). V nejspodnější řadě jsou jednotlivé histogramy směrů vláken ze zpracovaných mikrosnímků.

12.5 ZHODNOCENÍ UPRAVENÝCH ALGORITMŮ

V kapitole 12 byly ukázány dvě modifikace původního algoritmu tak, aby uměl rozlišit vzájemně kolmé směry.

První modifikace se týkala modré části světla. Změnilo se zarovnání analyzátoru, což vedlo k propuštění modré barvy světla s periodou 180° , což zpětně umožnilo vybavit algoritmus dodatečnými podmínkami k rozlišení vzájemně kolmých směrů vláken, přičemž výsledky z upraveného algoritmu byly testovány a jsou věrohodné. Upravený algoritmus je tedy schopný platně detekovat dominantní směrovou orientaci a disperzi kolagenních vláken. Pokud jsou analyzována jen kolagenní vlákna, výsledné histogramy jsou vhodnými kandidáty na kalibraci algoritmu založeného na FFT. Tímto způsobem by odpadla velmi pracná ruční kalibrace přes sub-obrázky s mnohonásobně větším zvětšením, která byla popsána v kapitole 7.1.2.

Algoritmus byl dále využit k detekci lokálních směrů zvlněných kolagenních vláken s cílem kvantifikovat vlnitost z výsledných histogramů orientací. V případě Achillových šlach bylo dosaženo pozitivních výsledků. Vlnitost kolagenních vláken by se v tomto případě dala korelovat s parametrem AAU (viz Obrázek 24). Nutností by však bylo větší množství snímků s odlišnou mírou zvlnění. Vzhledem k tomu, že bližší sledování struktury kolagenních vláken v Achillově šlaše nebylo náplní této práce, od vyšetřování korelace se nakonec upustilo.

V případě vzorků z medie aorty, a to jak z obvodově-axiální tak obvodově-radiální roviny, se vlnitost reprezentovanou dvěma vrcholy v histogramu nepodařilo vůbec identifikovat. Histogramy obsahovaly pouze jeden vrchol s jistou disperzí kolem něj. Částečně je tento efekt vysvětlitelný samotnou morfologií kolagenních vláken, neboť ačkoliv byla vlákna u AAA králíka (na několika snímcích – nikoliv na všech, viz Obrázek 50b) zvlněná a jejich vlnitost ručně měřitelná, vlákna se značně lišila od ideální sinusové vlny (dokonce netvořila ani periodicky se opakující zvlněnou strukturu), a proto nevznikly dva vrcholy, umožňující určení AAU. K tomu je nutné přiřadit fakt, že jsou do analýzy zahrnuta i vlákna, která nejsou zvlněná a svojí četností mohou histogram „zašumět“. Celá problematika automatického určení vlnitosti přímo z histogramů směrů kolagenních vláken tak není doposud vyřešena a je nutné se jí zabývat do budoucna.

V závěru doktorské práce je pak představena nová úprava algoritmu na zelenou barvu, která je podložena transmisním experimentem provedeným Ing. Petrem Dvořákem a Ing. Martinem Hrtoňem. Algoritmus byl kvalitativně otestován na dvou druzích mikrosnímků, tj. na Achillově šlaše s rovnými kolagenními vlákny a na mikrosnímku medie z prasečí aorty. Všechny histogramy ukázaly smysluplný rozsah úhlů s množstvím analyzovaných bodů $> 10^5$, tj. řádově více než je typické množství bodů analyzovaných při manuálním měření.

Obecně je možné naše zjištění a naprogramovaný nový algoritmus přiřadit do skupiny kvantitativní polarizované mikroskopie ([Massoumian et al. 2003](#)), se kterou je velmi podobný. Technika kvantitativní polarizované mikroskopie však využívá mnohem sofistikovanějších a samozřejmě i podstatně dražších zařízení a nástrojů jako je upravený konfokální mikroskop, zbrzdňovací (1/4 vlnové) destičky, automatizovaný rotační analyzátor, aj. Výhodou našeho přístupu je, že žádné takové zařízení není vůbec potřeba a metoda je velmi jednoduchá a reprodukovatelná.

13 NÁVRH DALŠÍ STUDIE

Po plánované verifikaci a validaci automatického algoritmu upraveného podle zelené barvy, který pracuje v rozsahu úhlů 0° – 180° , bude možné použít tento algoritmus na kalibraci algoritmu FFT.

Téměř celá tato studie se zabývala strukturou zdravé prasečí hrudní aorty. To jak vypadá struktura lidského AAA, je zatím prozkoumáno tímto způsobem

- a) Spíše histologicky zaměřené studie ([He a Roach 1994](#); [Lindeman et al. 2010](#)) ukazují, že v AAA téměř neexistuje klasická vrstevnatá struktura jako v případě zdravé AA. Vrstvy lze jen velmi složitě rozeznat. To bylo již ukázáno v kapitole [2.3](#).
- b) ([Gasser et al. 2012](#)) nachází ortotropní uspořádání vláken s větší disperzí v obvodově-axiální rovině než v rovině obvodově-radiální. Uvádí také, že mezi vrstvou adventicie a medie nebyl viděn žádný podstatný rozdíl. Uvedená studie byla opět provedena manuálním způsobem, což sebou nese vždy riziko špatné interpretovatelnosti výsledků (v důsledku závislosti výsledků na operátorovi, malého počtu měřených bodů, aj.).
- c) ([Sassani et al. 2015](#)) ukazuje, že jsou vlákna zarovnána dominantně obvodově s občasným výskytem diagonálních vláken, tj. velmi podobně jako v našich měřeních (viz [Polzer et al. 2015b](#)). Bohužel z textu není vůbec jasné, jak vyhodnocování dominantních směrů probíhalo.

Jen ze dvou studií (bod b a c) mohou být informace o vnitřní struktuře AAA nedostatečné, což dává potenciál se na tuto patologickou tkáň v budoucnosti zaměřit. Získané mikrosnímky patologické tkáně by měly být zpracovány

- a) kalibrovaným algoritmem FFT (s použitím fázové korelace) nebo
- b) algoritmem fázové korelace, kterým se zabývala kap. [12](#).

Stojí za zmínku, že navržený algoritmus může sloužit pro změření směrové orientace včetně disperze kolagenních vláken u jakékoli dvojlomné struktury, nikoliv jen v měkkých tkáních, které byly v rámci dizertační práce analyzovány. V rámci aktuálně přiděleného grantového projektu GAČR 18-13663S (2018–2020) - Výpočtové modelování rizika ruptury aterosklerotických plátů v krčních tepnách, by bylo možné aplikovat uvedený algoritmus k detekci směrů kolagenních vláken na aterosklerotickou krkavici (a. carotis communis), a to ve fibrózním krytu (čepičce), přilehlé intimě, stejně jako v medii a adventicii.

14 ZÁVĚR

Cílem této dizertační práce bylo určení vlivu uspořádání kolagenu na mechanické vlastnosti tepen. Motivací bylo posouzení věrohodnosti výpočtových modelů AAA využívajících vypočtených napětí pro predikci jejich ruptury. Z pohledu této motivace vznikly dvě studie, které zadané téma přesahují.

Zprvu byla provedena analýza způsobů vyhodnocování průměrů pomocí CT-A a bylo zjištěno, že se maximální průměr může měřit několika způsoby a hodnota významně závisí na rovině, ve které je tento průměr měřen. Tento fakt dává značně odlišné velikosti průměrů v případě šikmých aneurysmat, což může zcela změnit indikaci k chirurgické či jiné léčbě pacienta. Proto bylo změřeno 70 náhodně vybraných aneurysmat dvěma způsoby - jak v rovině transverzální (v rovině řezu), tak v rovině ortogonální (kolmé na střednici AAA). Následně byla provedena korelace mezi těmito změřenými průměry a alternativními parametry predikující rupturu AAA - tj. maximálním napětím ve stěně a parametrem rizika ruptury. Bylo zjištěno, že průměry získané měřením v ortogonální rovině mají s těmito alternativními parametry významně lepší korelaci, především pak pro šikmé geometrie, které tvoří významnou část AAA. Jedná se tedy o klinickou studii, která doporučuje měřit vždy ortogonální průměr.

Zadruhé, když se podařilo seskupit klinicky relevantní skupinu 70 aneurysmat, bylo vhodné na ní analyzovat vliv modelu materiálu na výsledné hodnoty maximálního napětí ve stěně tepny. Je totiž jasné, že kdyby se model materiálu dal zjednodušit použitím lineárně elastického modelu s dostatečně velkou tuhostí (vysoký modul pružnosti E), pak by veškeré zkoumání vnitřní struktury tkáně a mechanické testování bylo pouze tématem základního výzkumu bez klinické motivace. Autor této práce analýzu vlivu modelu materiálu provedl a zjistil, že vliv modelu materiálu na výsledné hodnoty PWS může být pro některá AAA významný (více než 20%) a navrhuje upřednostňovat reálnější modely materiálů než ty uměle vytvořené ačkoliv práce s nimi je velmi náročná.

Z literatury dále vyplývá, že i vliv anizotropie může být významný. Samotné anizotropní chování v tepnách je dáno uspořádáním kolagenních vláken, které bylo na základě předchozích prací mého školitele-specialisty prozkoumáno ve zdravé prasečí aortě pomocí kalibrovaného algoritmu FFT.

Výsledkem byla jedna rodina kolagenních vláken zarovnaná dominantně v obvodovém směru s rozptylem významně se měnícím po tloušťce stěny. V medii byl rozptyl malý a směrem k adventicii se zvětšoval tak, že vlákna přecházela do téměř izotropního uspořádání. Bylo také dokázáno, že kolagenní vlákna jsou zapojena do přenosu zatížení již při malých deformacích tepny. Určené strukturní parametry byly implementovány do dvou-vrstvového modelu Martufi-Gasser a tento model byl validován a byla posouzena jeho predikční schopnost.

Autor této dizertační práce také navrhl zcela nový automatický algoritmus, který ze snímků polarizované mikroskopie dokáže vyhodnotit orientaci kolagenních vláken v deseti až statisících bodech a značným způsobem tak překonává dosavadní manuální měření, které hodnotí max. 100 bodů na snímek. Princip algoritmu je založen na fázové korelaci snímků. Tento algoritmus byl původně omezen na detekci úhlů v rozsahu 0° – 90° daném principem polarizované mikroskopie se zkříženými filtry (tj. 90° mezi analyzátozem a polarizátorem). Autor této dizertační práce přestavil pozici filtrů na $\sim 85^{\circ}$ a zjistil, že toto uspořádání vede k propustnosti modré barvy světla s periodou 180° , což umožnilo upravit původní algoritmus tak, aby byl schopen pracovat v rozsahu 0° – 180° . Poměrně delší dobu však trvalo fyzikální zdůvodnění tohoto jevu, neboť alespoň podle nejlepších znalostí autora této práce, se v literatuře jiné než kolmé uspořádání filtrů nevyskytuje. Až nedávná spolupráce a transmisní měření provedené Ing. Petrem Dvořákem a Ing. Martinem Hrtoňem z Ústavu fyzikálního inženýrství zjištění autora zdůvodnilo a přivedlo ho na úpravu algoritmu pro zelenou barvu. Tato úprava je experimentálně zdůvodněna a aktuálně se připravuje rozpracovaný rukopis k publikaci do impaktovaného časopisu.

Protože je anizotropie a uspořádání kolagenních vláken významné u všech typů tepen je možné algoritmus použít i na jiné tkáně než které byly analyzovány v rámci této dizertační práce. V rámci aktuálně přiděleného grantového projektu GAČR 18-13663S (2018-2020) - Výpočtové modelování rizika ruptury aterosklerotických plátů v krčních tepnách, by bylo možné aplikovat uvedený algoritmus k detekci směrů kolagenních vláken na aterosklerotickou krkavici (a. carotis communis), a to ve fibrózním krytu (čepičce), přilehlé intimě, stejně jako v medii a adventicii.

REFERENCE

- Aarts N, Schurink G. Abdominal aortic aneurysm measurements for endovascular repair: intra-and interobserver variability of CT measurements. *Eur J Endovasc Surg.* 1999;18(6):1999–2001.
- Abada HT, Sapoval MR, Paul JF, de Maertelaer V, Mousseaux E, Gaux JC. Aneurysmal sizing after endovascular repair in patients with abdominal aortic aneurysm: Interobserver variability of various measurement protocols and its clinical relevance. *Eur Radiol.* 2003;13(12):2699–704.
- Alexander JJ. The pathobiology of aortic aneurysms. *J Surg Res.* 2004;117(1):163–75.
- Arruda EM, Boyce MC. A three-dimensional constitutive model for the large stretch behavior of rubber elastic materials. *J Mech Phys Solids.* 1993;41(2):389–412.
- Ayres CE, Jha BS, Meredith H, Bowman JR, Bowlin GL, Henderson SC, et al. Measuring fiber alignment in electrospun scaffolds: a user's guide to the 2D fast Fourier transform approach. *J Biomater Sci Polym Ed [Internet].* 2008;19(5):603–21.
- Baek S, Gleason RL, Rajagopal KR, Humphrey JD. Theory of small on large: Potential utility in computations of fluid-solid interactions in arteries. *Comput Methods Appl Mech Eng.* 2007;196(31–32):3070–8.
- Belohoubek J, Skardova L, Adamkova V. Incidence of abdominal aorta aneurysm among men older 65 years of age, ambulatory dispensarised at department of preventive cardiology. *Atherosclerosis.* 2017;263(2017):e158.
- Bursa J, Zemanek M. Evaluation of biaxial tension tests of soft tissues. *Stud Health Technol Inform.* 2008;133(Figure 1):45–55.
- Campa JS, Greenhalgh RM, Powell JT. Elastin degradation in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis.* 1987;65(1–2):13–21.
- Canham PB, Finlay HM, Boughner DR. Contrasting structure of the saphenous vein and internal mammary artery used as coronary bypass vessels. *Cardiovasc Res.* 1997;34(3):557–67.
- CANHAM PB, FINLAY HM, DIXON JG, BOUGHNER DR, CHEN A. Measurements From Light and Polarized-Light Microscopy of Human Coronary-Arteries Fixed At Distending Pressure. *Cardiovasc Res.* 1989;23(11):973–82.
- Canham PB, Talman E a, Finlay HM, Dixon JG. Medial collagen organization in human arteries of the heart and brain by polarized light microscopy. *Connect Tissue Res.* 1991;26(1–2):121–34.

- Carew TE, Vaishnav RN, Patel DJ. Compressibility of the arterial wall. *Circ Res.* 1968;23:61–8.
- Carlisle CR, Coulais C, Guthold M. The mechanical stress-strain properties of single electrospun collagen type I nanofibers. *Acta Biomater.* 2010;6(8):2997–3003.
- Cortes DH, Lake SP, Kadlowec JA, Soslowsky LJ, Elliott DM. Characterizing the mechanical contribution of fiber angular distribution in connective tissue: comparison of two modeling approaches. *Biomech Model Mechanobiol.* 11. říjen 2010;9(5):651–8.
- D'Amore A, Stella JA, Wagner WR, Sacks MS. Characterization of the complete fiber network topology of planar fibrous tissues and scaffolds. *Biomaterials.* 2010;31(20):5345–54.
- Darling RC, Messina CR, Brewster DC, Ottinger LW. Autopsy study of unoperated abdominal aortic aneurysms. The case for early resection. *Circulation.* 1977;56(3 Suppl):II161-4.
- Davarani-Zeinali S, Wang Y, Chow M-J, Turcotte R, Zhang Y. Contribution of Collagen Fiber Undulation to Regional Biomechanical Properties Along Porcine Thoracic Aorta. 2015;137(May):1–10.
- Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry.* 1989;93(1):27–9.
- Demiray H. A note on the elasticity of soft biological tissues. *J Biomech.* květen 1972;5(3):309–11.
- Dillavou ED, Buck DG, Muluk SC, Makaroun MS. Two-dimensional versus three-dimensional CT scan for aortic measurement. *J Endovasc Ther.* 2003;10(3):531–8.
- Dolber PC, Spach MS. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(3):465–9.
- Druckmullerova H. PHASE-CORRELATION BASED IMAGE REGISTRATION. 2010.
- Dugas A, Therasse É, Kauffmann C, Tang A, Elkouri S, Nozza A, et al. Reproducibility of abdominal aortic aneurysm diameter measurement and growth evaluation on axial and multiplanar computed tomography reformations. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2012;35(4):779–87.
- Elbischger PJ, Bischof H, Regitnig P, Holzapfel GA. Automatic analysis of collagen fiber orientation in the outermost layer of human arteries. *Pattern Anal Appl.* 2004;7(3):269–84.
- Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res.* 2002;20(6):1352–7.

- Feldman SA, Glagov S. S. a. feldman and s. glagov. 1971;(93):385–94.
- Finlay HM, McCullough L, Canham PB. Three-Dimensional Collagen Organization of Human Brain Arteries at Different Transmural Pressures. *J Vasc Res.* 1995;32(5):301–12.
- Fratzl P. Collagen: Structure and mechanics, an introduction. *Collagen: Structure and Mechanics.* 2008.
- Gasser TC, Auer M, Labruto F, Swedenborg J, Roy J. Biomechanical rupture risk assessment of abdominal aortic aneurysms: Model complexity versus predictability of finite element simulations. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;40(2):176–85.
- Gasser TC, Gallinetti S, Xing X, Forsell C, Swedenborg J, Roy J. Spatial orientation of collagen fibers in the abdominal aortic aneurysm's wall and its relation to wall mechanics. *Acta Biomater.* 2012;8(8):3091–103.
- Gasser TC, Görgülü G, Folkesson M, Swedenborg J. Failure properties of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm under static and pulsating mechanical loads. *J Vasc Surg.* 2008;48(1):179–88.
- Gasser TC, Nchimi A, Swedenborg J, Roy J, Sakalihasan N, Bäckler D, et al. A Novel Strategy to Translate the Biomechanical Rupture Risk of Abdominal Aortic Aneurysms to their Equivalent Diameter Risk: Method and Retrospective Validation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* březn 2014;47(3):288–95.
- Gasser TC, Ogden RW, Holzapfel GA. Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. *J R Soc Interface.* 2006;3(6):15–35.
- Vande Geest JP, Sacks MS, Vorp DA. The effects of aneurysm on the biaxial mechanical behavior of human abdominal aorta. *J Biomech.* 2006a;39(7):1324–34.
- Vande Geest JP, Wang DHJ, Wisniewsky SR, Makaroun MS, Vorp DA. Towards A Noninvasive Method for Determination of Patient-Specific Wall Strength Distribution in Abdominal Aortic Aneurysms. 2006b;34(7):1098–106.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1531–46.
- Grimshaw GM, Thompson JM. Changes in Diameter of the Abdominal Aorta with Age : An Epidemiological Study. 1997;(January):7–13.
- Groen HC, van Walsum T, Rozie S, Klein S, van Gaalen K, Gijzen FJH, et al. Three-dimensional registration of histology of human atherosclerotic carotid plaques to in-vivo imaging. *J Biomech.* 2010;43(11):2087–92.
- Gundiah N, Ratcliffe MB, Pruitt LA. The biomechanics of arterial elastin. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2009;2(3):288–96.

- Han HC. Nonlinear buckling of blood vessels: A theoretical study. *J Biomech.* 2008;41(12):2708–13.
- Harter LP, Gross BH, Callen PW, Barth RA. Ultrasonic evaluation of abdominal aortic thrombus. 1982;(October):315–8.
- He CM, Roach MR. The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1994;20(1):6–13.
- Holzapfel G a, Holzapfel G a, Sommer G, Sommer G, Gasser CT, Gasser CT, et al. Determination of layer-specific mechanical properties of human coronary arteries with nonatherosclerotic intimal thickening and related constitutive modeling. *Heart Circ Physiol.* 2005;289(5):2048–58.
- Holzapfel GA, Gasser TC, Ogden RW. A new constitutive framework for arterial wall mechanics and a comparative study of material models. *J Elast.* 2000;61(1–3):1–48.
- Holzapfel GA, Sommer G, Auer M, Regitnig P, Ogden RW. Layer-specific 3D residual deformations of human aortas with non-atherosclerotic intimal thickening. *Ann Biomed Eng.* 2007;35(4):530–45.
- Horný L, Adámek T, Kulvajtová M. A comparison of age-related changes in axial prestretch in human carotid arteries and in human abdominal aorta. *Biomech Model Mechanobiol.* 2016;1–9.
- Horný L, Netušil M, Voňavková T. Axial prestretch and circumferential distensibility in biomechanics of abdominal aorta. *Biomech Model Mechanobiol.* 2014;13(4):783–99.
- Chaikof EL, Blankensteijn JD, Harris PL, White GH, Zarins CK, Bernhard VM, et al. Reporting standards for endovascular aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2002;35(5):1048–60.
- Choi HS, Vito RP. Two-dimensional stress-strain relationship for canine pericardium. *J Biomech Eng.* 1990;112(May 1990):153–9.
- Joldes GR, Miller K, Wittek A, Doyle B. A simple, effective and clinically applicable method to compute abdominal aortic aneurysm wall stress. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016;58:139–48.
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11(4):447–55.
- Karlon WJ, Covell JW, McCulloch AD, Hunter JJ, Omens JH. Automated measurement of myofiber disarray in transgenic mice with ventricular expression of ras. *Anat Rec.* 1998;252(4):612–25.

- Kassab GS, Sacks MS. Structure-based mechanics of tissues and organs. *Structure-Based Mechanics of Tissues and Organs*. 2016.
- Kazi M, Thyberg J, Religa P, Roy J, Eriksson P, Hedin U, et al. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg*. 2003;38(6):1283–92.
- Keedy A. An overview of intracranial aneurysms. *McGill J Med*. 2006;9(2):141–6.
- Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, Riles TS, Manganaro A, Moskowitz AJ, et al. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg*. 2010;52(3):539–48.
- Khosla S, Morris DR, Moxon J V., Walker PJ, Gasser TC, Golledge J. Meta-analysis of peak wall stress in ruptured, symptomatic and intact abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg*. 2014;101(11):1350–7.
- Kochanek KD, Xu J, Murphy SL, Minino AM, Kung H-C. National Vital Statistics Reports Deaths : Final Data for 2009. *Natl Cent Heal Stat*. 2012;60(3):1–117.
- Krahn KN, Bouten CVC, Van Tuijl S, Van Zandvoort MAMJ, Merckx M. Fluorescently labeled collagen binding proteins allow specific visualization of collagen in tissues and live cell culture. *Anal Biochem*. 2006;350(2):177–85.
- Kubiček L, Staffa R, Vlachovský R, Polzer S, Kružliak P. Incidence of small abdominal aortic aneurysms rupture, impact of comorbidities and our experience with rupture risk prediction based on wall stress assessment. *Cor Vasa*. 2015;57(2):e127–32.
- Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*. 2012;95(2):194–204.
- Lanir Y. Constitutive equations for fibrous connective tissues. *J Biomech*. 1983;16(1):1–12.
- Lawton RW. The Thermoelastic Behavior of Isolated Aortic Strips of the Dog. *Circ Res*. 1954;2(4):344–53.
- Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Littooy FN, Bandyk D, et al. Prevalence and Associations of Abdominal Aortic Aneurysm Detected through Screening. 1997;126(6):441–9.
- Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, et al. Variability in measurement of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1995;21(6):945–52.
- Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, et al. Immediate Repair Compared with Surveillance of Small Abdominal Aortic Aneurysms. *N Engl J Med*. 9. květen 2002;346(19):1437–44.

- Lillie MA, Shadwick RE, Gosline JM. Mechanical anisotropy of inflated elastic tissue from the pig aorta. *J Biomech.* 2010;43(11):2070–8.
- Lindeman JHN, Ashcroft B a, Beenakker J-WM, van Es M, Koekkoek NBR, Prins F a, et al. Distinct defects in collagen microarchitecture underlie vessel-wall failure in advanced abdominal aneurysms and aneurysms in Marfan syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(2):862–5.
- Di Martino ES, Bohra A, Vande Geest JP, Gupta N, Makaroun MS, Vorp DA. Biomechanical properties of ruptured versus electively repaired abdominal aortic aneurysm wall tissue. *J Vasc Surg.* 2006;43(3):570–6.
- Martufi G, Gasser TC. A constitutive model for vascular tissue that integrates fibril, fiber and continuum levels with application to the isotropic and passive properties of the infrarenal aorta. *J Biomech.* 2011;44(14):2544–50.
- Martufi G, Satriano A, Moore RD, Vorp DA, Di Martino ES. Local Quantification of Wall Thickness and Intraluminal Thrombus Offer Insight into the Mechanical Properties of the Aneurysmal Aorta. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(8):1759–71.
- Massoumian F, Juskaitis R, Neil M a a, Wilson T. Quantitative polarized light microscopy. *J Microsc.* 2003;209(Pt 1):13–22.
- McGregor JC, Pollock JG, Anton HC. The value of ultrasonography in the diagnosis of abdominal aortic aneurysm. *Scott Med J.* 1975;20(3):133–7.
- McPhee JT, Hill JS, Eslami MH. The impact of gender on presentation, therapy, and mortality of abdominal aortic aneurysm in the United States, 2001-2004. *J Vasc Surg.* 2007;45(5):891–9.
- Medawar; P B. The rate of penetration of fixatives. *Roč. 535.286, Comparative Anatomy.* 1947.
- Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, et al. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;41(SUPPL. 1).
- Monk BA, George SJ. The Effect of Ageing on Vascular Smooth Muscle Cell Behaviour - A Mini-Review. *Gerontology.* 2014;61(5):416–26.
- Nicholls SC, Gardner JB, Meissner MH, Johansen KH. Rupture in small abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1998;28(5):884–8.
- Nissen R, Cardinale GJ, Udenfriendt S. Increased turnover of arterial collagen in hypertensive rats (hydroxyproline). *Med Sci.* 1978;75(1):451–3.
- Novak K, Polzer S, Bursa J. Applicability of simplified computational models in prediction of peak wall stress in abdominal aortic aneurysms. *Technol Heal Care.* 2017a;1:1–9.

- Novak K, Polzer S, Krivka T, Vlachovsky R, Staffa R, Kubicek L, et al. Correlation between transversal and orthogonal maximal diameters of abdominal aortic aneurysms and alternative rupture risk predictors. *Comput Biol Med.* 2017b;83(November 2016):151–6.
- Novak K, Polzer S, Tichy M, Bursa J. Automatic Evaluation of Collagen Fiber Directions from Polarized Light Microscopy Images. *Microsc Microanal.* 2015;1–13.
- O’Connell MK, Murthy S, Phan S, Xu C, Buchanan JA, Spilker R, et al. The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. *Matrix Biol.* 2008;27(3):171–81.
- Ouriel K, Green RM, Donayre C, Shortell CK, Elliott J, DeWeese JA. An evaluation of new methods of expressing aortic aneurysm size: relationship to rupture. *J Vasc Surg.* 1992;15(1):12–20.
- Peña JA, Martínez MA, Peña E. Layer-specific residual deformations and uniaxial and biaxial mechanical properties of thoracic porcine aorta. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;50:55–69.
- Petersen E, Boman J, Wågberg F, Bergström S, Ångquist KA. In vitro degradation of aortic elastin by chlamydia pneumoniae. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001;22(5):443–7.
- Polzer S, Gasser TC, Fleming C, Whitlock E, Beil T, Lederle F, et al. Biomechanical rupture risk assessment of abdominal aortic aneurysms based on a novel probabilistic rupture risk index. *J R Soc Interface.* 2015a;12(113):20150852.
- Polzer S, Gasser TC, Forsell C, Druckmüllerova H, Tichy M, Staffa R, et al. Automatic Identification and Validation of Planar Collagen Organization in the Aorta Wall with Application to Abdominal Aortic Aneurysm. *Microsc Microanal.* 9. prosinec 2013a;19(6):1395–404.
- Polzer S, Gasser TC, Novak K, Man V, Tichy M, Skacel P, et al. Structure-based constitutive model can accurately predict planar biaxial properties of aortic wall tissue. *Acta Biomater.* 2015b;14:133–45.
- Polzer S, Christian Gasser T, Bursa J, Staffa R, Vlachovsky R, Man V, et al. Importance of material model in wall stress prediction in abdominal aortic aneurysms. *Med Eng Phys.* 2013b;35(9):1282–9.
- Raghavan ML, Kratzberg J, Castro de Tolosa EM, Hanaoka MM, Walker P, da Silva ES. Regional distribution of wall thickness and failure properties of human abdominal aortic aneurysm. *J Biomech.* 2006;39(16):3010–6.

- Raghavan ML, Vorp DA. Toward a biomechanical tool to evaluate rupture potential of abdominal aortic aneurysm: Identification of a finite strain constitutive model and evaluation of its applicability. *J Biomech.* 2000;33(4):475–82.
- Raghavan ML, Webster MW, Vorp DA. Ex vivo biomechanical behavior of abdominal aortic aneurysm: assessment using a new mathematical model. *Ann Biomed Eng.* 1996;24(5):573–82.
- Raut SS, Jana A, De Oliveira V, Muluk SC, Finol EA. The Importance of Patient-Specific Regionally Varying Wall Thickness in Abdominal Aortic Aneurysm Biomechanics. *J Biomech Eng.* 2013;135(8):81010.
- Van Reeth E, Tham IWK, Tan CH, Poh CL. Super-resolution in magnetic resonance imaging: A review. *Concepts Magn Reson Part A.* listopad 2012;40A(6):306–25.
- Reuzé P, Coatrieux JL, Luo LM, Dillenseger JL. A 3-d moment based approach for blood vessel detection and quantification in MRA. *Technol Heal Care.* 1993;1(2):181–8.
- Rezakhaniha R, Agianniotis A, Schrauwen JTC, Griffa A, Sage D, Bouten CVC, et al. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomech Model Mechanobiol.* 2012;11(3–4):461–73.
- Rigberg DA, Zingmond DS, McGory ML, Maggard MA, Agustin M, Lawrence PF, et al. Age stratified, perioperative, and one-year mortality after abdominal aortic aneurysm repair: A statewide experience. *J Vasc Surg.* 2006;43(2):224–9.
- Rich L, Whittaker P. Collagen and Picrosirius Red Staining : a Polarized Light Assessment of Fibrillar Hue and Spatial Distribution. *Braz J Morphol Sci.* 2005;22(2):97–104.
- Rizzo RJ, McCarthy WJ, Dixit SN, Lilly MP, Shively VP, Flinn WR, et al. Collagen types and matrix protein content in human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1989;10(4):365–73.
- Roach MR, Burton AC. the Reason for the Shape of the Distensibility Curves of Arteries. *Biochem Cell Biol.* 1957;35(8):681–90.
- Rodríguez JF, Ruiz C, Doblaré M, Holzapfel GA. Mechanical Stresses in Abdominal Aortic Aneurysms: Influence of Diameter, Asymmetry, and Material Anisotropy. *J Biomech Eng.* 2008;130(2):21023.
- Ross MH, Pawlina W. *Histology: a Text and Atlas.*
- Roy CS. The Elastic Properties of the Arterial Wall. *J Physiol.* 1881;3(2):125–59.
- Roy S, Boss C, Rezakhaniha R, Stergiopoulos N. Experimental characterization of the distribution of collagen fiber recruitment. *J Biorheol.* 2010;24(2):84–93.

- Sáez P, García A, Peña E, Gasser TC, Martínez MA. Microstructural quantification of collagen fiber orientations and its integration in constitutive modeling of the porcine carotid artery. *Acta Biomater.* 2016;33:183–93.
- Sander EA, Barocas VH. Comparison of 2D fiber network orientation measurement methods. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2009;88(2):322–31.
- Sassani SG, Kakisis J, Tsangaris S, Sokolis DP. Layer-dependent wall properties of abdominal aortic aneurysms: Experimental study and material characterization. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;49:141–61.
- Scott JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem J.* 1988;252(2):313–23.
- Shadwick RE, Russell AP, Lauff RF. The structure and mechanical design of rhinoceros dermal armour. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1992;337:419–28.
- Shang EK, Nathan DP, Boonn WW, Lys-Dobradin IA, Fairman RM, Woo EY, et al. A modern experience with saccular aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2013;57(1):84–8.
- Sherman VR, Yang W, Meyers MA. The materials science of collagen. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;52:22–50.
- Schlösser FJV, Vaartjes I, van der Heijden GJMG, Moll FL, Verhagen HJM, Muhs BE, et al. Mortality After Elective Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Ann Surg.* 2010;251(1):158–64.
- Schrauwen JTC, Vilanova A, Rezakhaniha R, Stergiopulos N, van de Vosse FN, Bovendeerd PHM. A method for the quantification of the pressure dependent 3D collagen configuration in the arterial adventitia. *J Struct Biol.* 2012;180(2):335–42.
- Schriebl AJ, Reinisch AJ, Sankaran S, Pierce DM, Holzapfel GA. Quantitative assessment of collagen fibre orientations from two-dimensional images of soft biological tissues. *J R Soc Interface.* 2012a;9(76):3081–93.
- Schriebl AJ, Wolinski H, Regitnig P, Kohlwein SD, Holzapfel GA. An automated approach for three-dimensional quantification of fibrillar structures in optically cleared soft biological tissues. *J R Soc Interface.* 2012b;10(80):20120760–20120760.
- Schriebl AJ, Zeindlinger G, Pierce DM, Regitnig P, Holzapfel GA. Determination of the layer-specific distributed collagen fibre orientations in human thoracic and abdominal aortas and common iliac arteries. *J R Soc Interface.* 2012c;9(71):1275–86.
- Singh K, Jacobsen BK, Solberg S, Bønaa KH, Kumar S, Bajic R, et al. Intra- and interobserver variability in the measurements of abdominal aortic and common iliac artery diameter with computed tomography. The Tromsø study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003;25(5):399–407.

- Skacel P, Bursa J. Poisson's ratio of arterial wall - Inconsistency of constitutive models with experimental data. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016;54:316–27.
- Skibba AA, Evans JR, Hopkins SP, Yoon HR, Katras T, Kalbfleisch JH, et al. Reconsidering gender relative to risk of rupture in the contemporary management of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2015;62(6):1429–36.
- Slazansky M, Polzer S, Man V, Bursa J. Analysis of Accuracy of Biaxial Tests Based on their Computational Simulations. *Strain.* 2016;52(5):424–35.
- Smith JFH, Canham PB, Starkey J. Orientation of collagen in the tunica adventitia of the human cerebral artery measured with polarized light and the universal stage. *J Ultrastructure Res.* 1981;77(2):133–45.
- Sokolis DP. Passive mechanical properties and constitutive modeling of blood vessels in relation to microstructure. 2008;1187–99.
- Speelman L, Bosboom EMH, Schurink GWH, Buth J, Breeuwer M, Jacobs MJ, et al. Initial stress and nonlinear material behavior in patient-specific AAA wall stress analysis. *J Biomech.* 2009;42(11):1713–9.
- Sprouse LR, Meier GH, LeSar CJ, DeMasi RJ, Sood J, Parent FN, et al. Comparison of abdominal aortic aneurysm diameter measurements obtained with ultrasound and computed tomography: Is there a difference? *J Vasc Surg.* 2003;38(3):466–72.
- Suvarna K, Bancroft J. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques.
- Timmins LH, Wu Q, Yeh AT, Moore JE, Greenwald SE. Structural inhomogeneity and fiber orientation in the inner arterial media. *AJP Hear Circ Physiol.* 2010;298(5):H1537–45.
- Tong J, Cohnert T, Regitnig P, Holzapfel GA. Effects of age on the elastic properties of the intraluminal thrombus and the thrombus-covered wall in abdominal aortic aneurysms: Biaxial extension behaviour and material modelling. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;42(2):207–19.
- Treloar. The physics of rubber elasticity. 1975.
- Tsamis A, Phillippi JA, Koch RG, Pasta S, D'Amore A, Watkins SC, et al. Fiber micro-architecture in the longitudinal-radial and circumferential-radial planes of ascending thoracic aortic aneurysm media. *J Biomech.* 2013;46(16):2787–94.
- UK Small Aneurysm Trial Participants. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. *Lancet.* 1998;352(9141):1649–55.
- Ushiki T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Roč. 65, Archives of Histology and Cytology.* 2002. s. 109–26.

- van 't Veer M, Buth J, Merks M, Tonino P, van den Bosch H, Pijls N, et al. Biomechanical properties of abdominal aortic aneurysms assessed by simultaneously measured pressure and volume changes in humans. *J Vasc Surg.* 2008;48(6):1401–7.
- Vesely J, Horny L, Chlup H, Zitny R. Collagen Orientation and Waviness within the Vein Wall. *Comput Plast Xi Fundam Appl.* 2011;720–8.
- Virmani R, Avolio AP, Mergner WJ, Robinowitz M, Herderick EE, Cornhill JF, et al. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *Am J Pathol.* 1991;139(5):1119–29.
- Vorp DA. Biomechanics of abdominal aortic aneurysm. *J Biomech.* 2007;40(9):1887–902.
- Wanhainen A, Bergqvist D, Björck M. Measuring the abdominal aorta with ultrasonography and computed tomography - Difference and variability. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002;24(5):428–34.
- Weibull W. A statistical distribution function of wide applicability. *Roč. 18, Journal of applied mechanics.* 1951. s. 293–7.
- Wicker BK, Hutchens HP, Wu Q, Yeh a T, Humphrey JD. Normal basilar artery structure and biaxial mechanical behaviour. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2008;11(5):539–51.
- Wolinsky BH, Glagov S. Structural Basis for the Static Mechanical Properties of the Aortic Media. 1964;XIV(May).
- Wolinsky H, Glagov S. A Lamellar Unit of Aortic Medial Structure and Function in Mammals. *Circ Res.* 1967;20(1):99–111.
- Wolman M, Kasten FH. Polarized light microscopy in the study of the molecular structure of collagen and reticulin. *Histochemistry.* 1986;85(1):41–9.
- Xu F, Beyazoglu T, Hefner E, Gurkan UA, Demirci U. Automated and adaptable quantification of cellular alignment from microscopic images for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(6):641–9.
- Xu J, Murphy SL, Kochanek KD, Bastian BA. National Vital Statistics Reports Deaths : Final Data for 2013. *Natl Cent Heal Stat.* 2016;64(2):1–118.
- Yeoh OH. Characterization of Elastic Properties of Carbon-Black-Filled Rubber Vulcanizates. *Roč. 63, Rubber Chemistry and Technology.* 1990. s. 792–805.
- Yeoh OH. Some Forms of the Strain Energy Function for Rubber. *Roč. 66, Rubber Chemistry and Technology.* 1993. s. 754–71.
- Zelaya JE, Goenezen S, Dargon PT, Azarbal A-F, Rugonyi S. Improving the Efficiency of Abdominal Aortic Aneurysm Wall Stress Computations. *PLoS One.* 2014;9(7):e101353.